

อิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายจากเชื้อรา *Trichoderma* spp.

Effect of carbon source on degrading enzyme activities derived from *Trichoderma* spp.

ศุภลักษณ์ หล้าจันทึก¹ และ วีระศักดิ์ สักดิ์ศิริรัตน์^{1,2*}

Supalaksana Lhachantuek¹ and Weerasak Saksirirat^{1,2*}

บทคัดย่อ: เชื้อรา *Trichoderma* spp. เป็นเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีเอนไซม์ย่อยสลายเป็นกลไกสำคัญในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช ซึ่งจากการทดลองนำเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 35 ไอโซเลต มาตรวจสอบอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase, chitinase และ protease ในเชิงปริมาณ พบว่าไอโซเลต 38 ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนมีกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase สูงสุดคือ 619.70 $\mu\text{mol}(\text{glucose equivalent})/\text{mg protein/hr}$ กิจกรรมของเอนไซม์ chitinase สูงคือ 146.61 $\mu\text{mol}(\text{GlcNAc equivalent})/\text{mg protein/hr}$ เมื่อใช้ colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับในกิจกรรมของเอนไซม์ protease นั้นไอโซเลต T4 ที่มี colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอนมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงคือ 12.32 $\mu\text{mol}(\text{tyrosine equivalent})/\text{mg protein/hr}$ การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าแหล่งคาร์บอนมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp.

คำสำคัญ: แหล่งคาร์บอน, เอนไซม์ย่อยสลาย, เชื้อรา *Trichoderma* spp.

Abstract: Degrading enzymes are major mechanism of biological control property of *Trichoderma* spp. The degrading enzyme activity of β -1,3-glucanase, chitinase and protease derived from 35 isolates of *Trichoderma* spp. cultured on different carbon sources were investigated. Among different carbon sources, glucose was suitable carbon source for isolate 38 which producing highest β -1,3-glucanase activity of 619.70 $\mu\text{mol}(\text{glucose equivalent})/\text{mg protein/hr}$. The same isolate was cultivated in medium containing colloidal chitin as sole carbon source. This isolate secreted highest chitinolytic activity of 146.61 $\mu\text{mol}(\text{GlcNAc equivalent})/\text{mg protein/hr}$. For protease activity, colloidal chitin was suitable carbon source for cultivation of isolate T4, which expressing highest protease activity of 12.32 $\mu\text{mol}(\text{tyrosine equivalent})/\text{mg protein/hr}$. This study suggests the effect of carbon sources on degrading enzyme activities of antagonistic fungus, *Trichoderma* spp.

Key words: carbon source, degrading enzyme, *Trichoderma* spp.

¹ สาขาวิชาโรคพืชวิทยา ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

¹ Plant Pathology Section, Department of Plant Science and Agricultural Resources, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

² ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยร่วม มหาวิทยาลัยขอนแก่น และศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร เพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

² Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok, Thailand and Agricultural Biotechnology Research Center for Sustainable Economy, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

* Corresponding author: weerasak@kku.ac.th

บทนำ

เชื้อรา *Trichoderma* spp. เป็นเชื้อราปฏิปักษ์ที่สามารถเจริญแข่งขันกับเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ดี (Johnson et al., 1987) และมีกลไกในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายกลไก เช่น การสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis) เช่น สาร gliotoxin และ trichodermin ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Sclerotium mericana* และ *Pythium ultimum* สาเหตุโรคเน่าคอดิน (damping-off) ของต้นบวบขึ้นเป็นต้น (Lumsden et al., 1992) เชื้อราปฏิปักษ์นี้มีการเจริญเติบโตสร้างเส้นใยและสปอร์ได้ค่อนข้างเร็ว จึงมีความสามารถในการแก่งแย่งแข่งขันกับเชื้อสาเหตุโรคพืชด้านการใช้อาหารและแร่ธาตุต่างๆ จากแหล่งอาหารในธรรมชาติ และยังมีกลไกการเป็นปรสิตที่มีการสร้างเอนไซม์ย่อยสลาย (extracellular degrading enzymes) เช่น chitinase, protease และ β -1,3-glucanase ทำหน้าที่ในการสลายพันธะที่เชื่อมต่อกันของ chitin, protein, β -1,3-glucan สารเหล่านี้เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิดเช่น *S. rolfii*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Pythium ultimum* และ *Sclerotium mericana* เป็นต้น ทำให้ผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้รับความเสียหาย เนื่องจากเอนไซม์ดังกล่าวมีความสำคัญต่อประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase, chitinase, protease เพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ในแง่การผลิตมวลชีวภาพหรือเป็นข้อมูลในการวิเคราะห์หาคุณสมบัติอื่นๆของเอนไซม์ย่อยสลายต่อไป

วิธีการศึกษา

การรวบรวมเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp.

รวบรวมเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. จากการศึกษาที่มีมาก่อนหน้านี้ (สุวิดา, 2549) ซึ่งเป็น

ไอโซเลตที่ตรวจสอบเบื้องต้นแล้วพบว่ามีความสามารถในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ดี มีจำนวน 35 ไอโซเลต

การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายในเชิงปริมาณ

เตรียม culture filtrate โดยเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 35 ไอโซเลต ในอาหาร PDB เป็นเวลา 7 วัน กรองเอาเส้นใยออกด้วยกระดาษกรอง นำ culture filtrate ของเชื้อรา *Trichoderma* มาตกตะกอนโปรตีน จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีการของ Bradford (1976) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve) โดยใช้ bovine serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐาน และทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ในเชิงปริมาณของเอนไซม์ β -1,3-glucanase, chitinase โดยการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกย่อยออกจาก substrate ซึ่งใช้วิธีการของ Somogyi (1952) และ protease คัดแปลงตามวิธีของ Yang and Wang (1999) และคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. 3 ไอโซเลตที่มีกิจกรรมเอนไซม์ β -1,3-glucanase, chitinase และ protease สูงสุดเพื่อนำไปศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์นี้ต่อไป

การศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลาย

โดยนำเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* ไอโซเลตที่คัดเลือกแล้ว เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TM medium (ประยุกต์ตามวิธีของ Noronha and Ulhoa, 2000) ที่มีส่วนผสมของกลูโคส, colloidal chitin, เส้นใยเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *S. rolfii*, *Pythium* sp. และเห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*) เป็นแหล่งคาร์บอนต่างๆอยู่ในอัตราส่วน 0.5% ของอาหาร ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อ TM ประกอบด้วย 0.1% bactopectone, 0.03% ยูเรีย, 0.2% KH_2PO_4 , 1.4% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.03% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และ 0.1% สารละลายของธาตุอาหาร (Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+}) เลี้ยงนาน 7 วัน กรองเอาเส้นใยเชื้อรา *Trichoderma* ออก นำ culture filtrate ไปตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์

ในเชิงปริมาณของเอนไซม์ β -1,3-glucanase, chitinase และ protease วางแผนการทดลองแบบ CRD 3 ซ้ำ

ผลการศึกษาและวิจารณ์

จากการทดลองพบว่าไอโซเลต 38, T13 และ 103 มีกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase สูงคือ 596.32, 111.23 และ 73.09 $\mu\text{mol}(\text{glucose equivalent})/\text{mg protein/hr}$ (Table 1) กิจกรรมของเอนไซม์ chitinase สูงในไอโซเลต 38, 90, 122 คือ 144.21, 100.24 และ 93.50 $\mu\text{mol}(\text{GlcNAc equivalent})/\text{mg protein/hr}$ (Table 2) ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ protease สูงในไอโซเลต T4, T10 และ T9 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงคือ 11.82, 10.51 และ 9.62 $\mu\text{mol}(\text{tyrosine equivalent})/\text{mg protein/hr}$ ตามลำดับ (Table 3) และเมื่อนำมาตรวจสอบอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายนั้นพบว่าในไอโซเลต 38 ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ไอโซเลต T13 ที่มี *S. rofsii* เป็นแหล่งคาร์บอน และไอโซเลต 103 กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นมีกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase สูงคือ 619.70, 166.16 และ 116.19 $\mu\text{mol}(\text{glucose equivalent})/\text{mg protein/hr}$ ตามลำดับ (Table 4) กิจกรรมของเอนไซม์ chitinase สูงในไอโซเลต 38 ที่มี colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน ไอโซเลต 90 ที่มี *Pythium* sp. เป็นแหล่งคาร์บอน และ ไอโซเลต 122 ที่มีเห็ดฟางเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น มีกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase สูงคือ 146.61, 86.00 และ 100.36 $\mu\text{mol}(\text{GlcNAc equivalent})/\text{mg protein/hr}$ (Table 5) ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ protease สูงในไอโซเลต T4, T10 และ T9 ที่มี colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 12.32, 11.50 และ 10.09 $\mu\text{mol}(\text{tyrosine equivalent})/\text{mg protein/hr}$ ตามลำดับ (Table 6)

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายในเชิงปริมาณของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้งหมด 35 ไอโซเลต พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลต 38, T13 และ 103 มีกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase สูง กิจกรรมของเอนไซม์ chitinase สูงในไอโซเลต 38, 90, 122 และกิจกรรมของเอนไซม์ protease นั้นเชื้อรา *Trichoderma* spp. แทบทุก ไอโซเลตมีกิจกรรมของเอนไซม์ protease สูง แต่จะพบสูงมากในไอโซเลต T4, T10 และ T9 ตามลำดับ และเมื่อนำเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตที่คัดเลือกแล้วมาศึกษาถึงอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายพบว่า ไอโซเลต 38 ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นมีกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase สูงสุดคือ 619.70 $\mu\text{mol}(\text{glucose equivalent})/\text{mg protein/hr}$ คือมีความสามารถในการย่อยกลูโคสได้ดี กิจกรรมของเอนไซม์ chitinase สูง ในไอโซเลต 38 ที่มี colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอนคือมีความสามารถในการย่อย colloidal chitin ได้ 146.61 $\mu\text{mol}(\text{GlcNAc equivalent})/\text{mg protein/hr}$ ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ protease นั้นพบได้สูงในทุกแหล่งคาร์บอนแต่จะสูงสุดในไอโซเลต T4 ที่มี colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอนคือมีความสามารถในการย่อย tyrosine ได้ 12.32 $\mu\text{mol}(\text{tyrosine equivalent})/\text{mg protein/hr}$ จึงทำให้ทราบแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์ดังกล่าวมีความสำคัญต่อประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. และเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ในด้านการผลิตมวลชีวภาพหรือเป็นข้อมูลในการวิเคราะห์หาคุณสมบัติอื่นๆของเอนไซม์ย่อยสลายต่อไป

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร (AG-

BIO/PERDO-CHE) สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัย
ด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงาน
คณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ
และศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อ
เศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

สุวิดา แสไพศาล. 2549. เอนไซม์ย่อยสลาย
ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลี
โอไทป์ในส่วน ITS1-5.8S-ITS2 ของ rDNA
และการโคลนยีนไคตินเนสของเชื้อรา
Trichoderma spp. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศา
สตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method
for the quantitation of microgram quantities
of protein-dye binding. Analytical
Biochemistry 72 : 248-254.

Johnson, L.E., E.C. Bernard, and P. Qian. 1987.
Isolation of *Trichoderma* spp. at low

temperature from Tennessee and Alaska
soil. Plant Disease 71 : 137-140.

Lumsden, R.D., J.C. Locke, S.T. Adkins, J.F. Walter,
and C.J. Ridout. 1992. Isolation and
localization of the antibiotic gliotoxin
produced by *Gliocadium virens* from
alginate prill in soil and soiled media.
Phytopathology 82 : 230-235.

Noronha, E.F., and C.J. Ulhoa. 2000. Characterization
of 29-kDa β -1,3-glucanase from
Trichoderma harzianum. FEMS
Microbiology Letters 183 : 119-123.

Somogyi, M. 1952. Noted on sugar determination.
Journal of Biological Chemistry 195 : 19-23.

Yang, S.S. and Y. Wang. 1999. Protease and amylase
production of *Streptomyces rimosus* in
submerged and solid state cultivations.
Botanical Bulletin Academia Sinica 40 :
259-265.

Table 1 β -1,3-glucanase activity of 35 isolates of *Trichoderma* spp.

isolate	enzyme activity [$\mu\text{mol}(\text{glu})/\text{mg protein/hr}$]	isolate	enzyme activity [$\mu\text{mol}(\text{glu})/\text{mg protein/hr}$]	isolate	enzyme activity [$\mu\text{mol}(\text{glu})/\text{mg protein/hr}$]
T1	0.11 g	T25	4.46 fg	90	51.75 d
T4	26.51 e	T30	31.27 e	103	73.09 c
T9	26.67 e	T35	27.78 e	106	0.46 g
T10	60.21 d	38	596.32 a	111	1.2 g
T13	111.23 b	57	0.65 g	115	0.29 g
T14	5.46 fg	67	0.54 g	119	1.71 g
T17	1.81 g	74	26.46 e	122	0.6 g
T18	4.63 fg	77	7.46 fg	133	12.15 f
T19	0.31 g	78	1.18 g	139	2.63 fg
T20	3.89 fg	85	1.59 g	162	1.74 g
T21	1.8 g	88	1.57 g	177	1.57 g
T24	7.24 fg	89	0.75 g	C.V. (%)	15.01

Means in the same column followed by different letters are significantly different at $P \leq 0.01$ by DMRT

Table 2 Chitinase activity of 35 isolates of *Trichoderma* spp.

isolate	enzyme activity [GlcNAc- μ mol/mg	isolate	enzyme activity [GlcNAc- μ mol/mg	isolate	enzyme activity [GlcNAc- μ mol/mg protein/hr]
T1	4.56 jk	T25	9.51 bc	90	8.98 cd
T4	11.82 a	T30	9.40 bc	103	9.52 bc
T9	9.62 bc	T35	9.03 bd	106	9.36 bc
T10	10.51 ab	38	7.49 defg	111	9.45 bc
T13	7.45 efg	57	1.60 mno	115	9.50 bc
T14	7.16 fgh	67	9.58 bc	119	8.30 cdef
T17	8.27 cdef	74	8.98 cd	122	5.76 hij
T18	6.37 ghi	77	6.88 fghi	133	5.56 ij
T19	3.96 kl	78	0.81 no	139	2.67 lm
T20	9.53 bc	85	9.52 bc	162	2.39 m
T21	0.52 o	88	4.05 kl	177	8.83 cde
T24	9.41 bc	89	2.04 mn	C.V. (%)	9.84

Means in the same column followed by different letters are significantly different at $P \leq 0.01$ by DMRT

Table 4 Effect of carbon source on β -1,3-glucanolytic activity of 3 isolates of *Trichoderma* spp.

carbon source	<i>Trichoderma</i> spp. isolate		
	38	T13	103
<i>Pythium</i> sp.	9.01 b	7.11 d	2.27 d
<i>S. rolfsii</i>	43.33 b	166.16 a	47.40 b
colloidal chitin	19.17 b	1.78 e	0.00 d
glucose	619.70 a	59.56 b	116.19 a
<i>V. volvacea</i>	21.83 b	5.51 d	32.05 c
<i>Fol</i>	1.37 b	10.42 c	2.39 d
C.V. (%)	25.16	2.16	7.17

Means in the same column followed by different letters are significantly different at $P \leq 0.01$ by DMRT

Table 5 Effect of carbon source on chitinolytic activity of 3 isolates of *Trichoderma* spp.

carbon source	<i>Trichoderma</i> spp. isolate				
	38	90	122		
<i>Pythium</i> sp.	34.21 c	86.00 a	75.36 b		
protein/hr]		protein/hr]			
T1	1.18 o	T25	0.79 o	90	100.24 b
T4	27.10 fg	T30	25.26 fgh	103	24.63 fgh
T9	29.09 fg	T35	14.90 ijk	106	63.47 d
T10	66.39 d	38	144.21 a	111	43.38 e
T13	25.96 fg	57	4.84 mno	115	32.44 f
T14	4.51 mno	67	32.30 f	119	1.03 o
T17	8.28 klmno	74	13.20 jkl	122	93.50 bc
T18	28.01 fg	77	88.59 c	133	86.49 c
T19	3.28 no	78	43.19 e	139	22.65 ghi
T20	17.61 hij	85	9.85 jklmn	162	13.77 jkl
T21	4.52 mno	88	23.22 gh	177	12.42 jklm
T24	28.70 fg	89	6.32 lmno	C.V. (%)	11.40

Means in the same column followed by different letters are significantly different at $P \leq 0.01$ by DMRT

Table 3 Protease activity of 35 isolates of *Trichoderma* spp.

isolate	enzyme activity [tyrosine- μmol/mg protein/hr]	isolate	enzyme activity [tyrosine- μmol/mg protein/hr]	isolate	enzyme activity [tyrosine- μmol/mg protein/hr]
<i>S. rolfsii</i>	4.48 d		3.29 cd		3.82 d
colloidal chitin	146.61 a		2.63 d		4.35 d
glucose	33.28 c		8.58 bc		6.30 d
<i>V. volvacea</i>	85.57 b		10.25 b		100.36 a
<i>Fol</i>	23.97 c		4.39 cd		38.40 c
C.V. (%)	8.65		11.48		6.01

Means in the same column followed by different letters are significantly different at $P \leq 0.01$ by DMRT

Table 6 Effect of carbon source on proteolytic activity of 3 isolates of *Trichoderma* spp.

carbon source	<i>Trichoderma</i> spp. isolate		
	T4	T10	T9
<i>Pythium</i> sp.	6.54 bc	5.10 c	2.12 c
<i>S. rolfsii</i>	4.62 c	5.48 c	2.72 c
colloidal chitin	12.32 a	11.50 a	10.09 a
glucose	6.87 bc	9.16 b	7.39 b
<i>V. volvacea</i>	8.18 b	8.60 b	7.58 b
<i>Fol</i>	4.58 c	4.25 c	2.89 c
C.V. (%)	16.23	8.03	10.63

Means in the same column followed by different letters are significantly different at $P \leq 0.01$ by DMRT