รายงานการวิจัย

เรื่อง

การแยกจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสจากกระเพาะส่วนต้นของวัว

(Isolation of Cellulose-degrading Microorganism from the Rumen of Cow)

คณะผู้วิจัย

อพัชชา วงศ์เจริญสถิตย์

วราวุฒิ ครูส่ง

รงการสนับสนุนงานวิจัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประจำปีงบประมาณ 2543

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัย

T100984

เรื่อง

การแยกจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสจากกระเพาะส่วนต้นของวัว

(Isolation of Cellulose-degrading Microorganism from the Rumen of Cow)

คณะผู้วิจัย

อพัชชา วงศ์เจริญสถิตย์

วราวุฒิ ครูส่ง

RCH
QR
141
.R85
ป246ร
ฉ.2

สาขหมู่.....
เลขทะเบียน 100984
วัน.เดือน.ปี 22 JUN 2000

โครงการสนับสนุนงานวิจัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประจำปีงบประมาณ 2543
ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

จากการแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสจากกระเพาะส่วนต้นของวัว โดยแยกแบคทีเรียในอาหารที่มีองค์ประกอบของเซลลูโลส 3 สูตร คือ rumen fluid cellulose, Mc Beth's cellulose ammonium sulfate และ Petterson's media จากนั้นทำการแยก และเลี้ยงเชื้อในอาหาร Petterson's media สามารถแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้จำนวน 32 ไอโซเลท และเมื่อนำแบคทีเรียที่แยกได้ เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร carboxymethylcellulose (CMC agar) ทดสอบการเกิดวงใสหลังจากราดทับด้วย congo red พบเชื้อแบคทีเรียที่เกิดวงใสชัดเจนจำนวน 7 ไอโซเลท เมื่อนำแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี carboxymethylcelluose (CMC) 1.0 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย peptone 0.5 เปอร์เซ็นต์ KH_2PO_4 0.5 เปอร์เซ็นต์ $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ yeast extract 0.5 เปอร์เซ็นต์ บ่มเชื้อในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน นำมาหากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส พบแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูง 4 ไอโซเลท คือ สายพันธุ์ที่ 3, 25, 29 และ 32 ตามลำดับ และการวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียอยู่ในจีนัสของ *Lachnospira Bacteroides* และ *Butyrivibrio*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

The isolation of cellulose-degrading bacteria from the rumen of cow samples was done by cultivation the bacteria on three medium containing with cellulose i.e. rumen fluid cellulose, Mc Beth's cellulose ammonium sulfate and Petterson's media. Then the pure isolates were culture on Petterson's media. The 32 isolates of bacteria were obtained and cultured on carboxymethylcellulose (CMC agar) for clear zone formation tests with congo red. The 7 isolates produced distinctly clear zone. These bacteria were screened for cellulolylic activity in the medium of the following composition carboxymethylcelluose (CMC) 1.0 %, peptone 0.5 %, KH_2PO_4 0.5 %, $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 % and yeast extract 0.5 %. The culturing of these bacteria was incubated at 39°C for 7 days. The result showed that there are 4 isolates (e.g. 3, 25, 29 and 32) could produce high cellulase enzyme. The identification of these bacteria revealed as *Lachnospira*, *Bacteroides* and *Butyrivibrio* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนงานวิจัยจากงบประมาณ ประจำปี 2543 ของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างในการทำวิจัย ขอขอบคุณ คุณสุธีรวัฒน์ พันธุ์มาลัย ที่ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง นายธนาสิน ธนอนันต์โชค นางสาวสุภาพรรณ โรจน์อัมพร และนางสาวสุฤทัย ล้ำประเสริฐ นักศึกษาภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร ที่ช่วยเหลือในการเก็บข้อมูล และโครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร (ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร) คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความอนุเคราะห์ อุปกรณ์และเครื่องมือห้องปฏิบัติการในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
ขอบเขตการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	15
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	18
สรุปผลการทดลอง	25
เอกสารอ้างอิง	26
ภาคผนวก	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทนำ

เซลลูโลส (Cellulose) เป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่ง โครงสร้างประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกัน (Fogarty, 1983; Moat and Foster, 1995) พบมากที่สุดในธรรมชาติ เป็นส่วนประกอบหลักในพืชทุกชนิด วัตถุเหลือทิ้งทางการเกษตร และป่าไม้ ของเสียต่างๆที่มีองค์ประกอบด้วยเซลลูโลสในอาหาร เคมี และเชื้อเพลิง รวมทั้งโรงงานอุตสาหกรรมที่ใช้วัตถุดิบทางการเกษตร (Fogarty, 1983; Gong et al., 1999) วัตถุดิบและของเสียต่างๆเหล่านี้ มีปริมาณมากขึ้นทุกปี ซึ่งมีปัญหาในการกำจัดและสร้างมลพิษให้กับสิ่งแวดล้อม (Benoit et al., 1992)

การนำวัตถุดิบต่างๆที่ประกอบด้วยเซลลูโลส มาใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่า ได้รับการสนใจอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะการใช้เซลลูโลสเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆโดยผ่านกระบวนการหมัก เช่น แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ต่างๆ โปรตีนเซลล์เดียว และอาหารสัตว์ เป็นต้น (Fogarty, 1983; Gong et al., 1999) ซึ่งกระบวนการเปลี่ยนเซลลูโลสในวัตถุดิบต่างๆนั้น อาศัยจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งสามารถย่อยสลายเซลลูโลสให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ นอกจากนี้ยังสามารถนำเอนไซม์เซลลูเลสไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การผลิตเชื้อเพลิงและสารเคมี (Beguin and Aubert, 1992) อุตสาหกรรมอาหาร และอาหารสัตว์ (ปราณี, 2533) เป็นต้น

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส (Cellulose-degrading microorganism) พบมากในกลุ่มของเชื้อรา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยซีติส (Fogarty, 1983) เชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ เช่น *Acetivibrio*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Celluvibrio*, *Cytophaga*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* และ *Thermomonospora* เป็นต้น (Stutzenberger, 1990; Rapp and Beermann, 1991) จุลินทรีย์เหล่านี้พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ดิน ปุ๋ยหมัก ของเสียจากเทศบาล (Benoit et al., 1992) โคลนและตะกอนในน้ำบริสุทธิ์และน้ำทะเล ลำไส้ของสัตว์ (Beguin and Aubert, 1992) รวมทั้งในกระเพาะส่วนต้นของสัตว์เคี้ยวเอื้อง (เมธา, 2533; Hungate, 1947; Dehority, 1991; Beguin and Aubert, 1992 ; Patterson; 1992; Foong et al., 1997)

กระเพาะส่วนต้นของสัตว์เคี้ยวเอื้องหรือกระเพาะรูเมน เป็นแหล่งของจุลินทรีย์หลายชนิด โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส (เมธา, 2533) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส จากกระเพาะส่วนต้นของวัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยทำการเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบของเซลลูโลส เพื่อใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายเซลลูโลส และนำไปใช้ในการเพิ่มคุณค่าวัตถุดิบเหลือทิ้งจากการเกษตรต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสจากกระเพาะส่วนต้นของวัว
2. เพื่อจำแนกชนิด และสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส

ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสจากกระเพาะส่วนต้นของวัว โดยทำการเลี้ยงในอาหารที่ที่มีองค์ประกอบของเซลลูโลส จากนั้นหาประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ได้สูง ทำการเตรียมเชื้อให้บริสุทธิ์ เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อ สมบัติทางชีวเคมีต่างๆเพื่อจำแนกชนิดและสายพันธุ์จุลินทรีย์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบชนิด และสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยเซลลูโลสจากกระเพาะส่วนต้นของวัว ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส และนำจุลินทรีย์ไปใช้ในการเพิ่มคุณค่าของวัตถุดิบเหลือทิ้งจากการเกษตรและป่าไม้ และวัตถุดิบต่างๆที่ประกอบด้วยเซลลูโลส ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อทางด้านเกษตร และอุตสาหกรรม

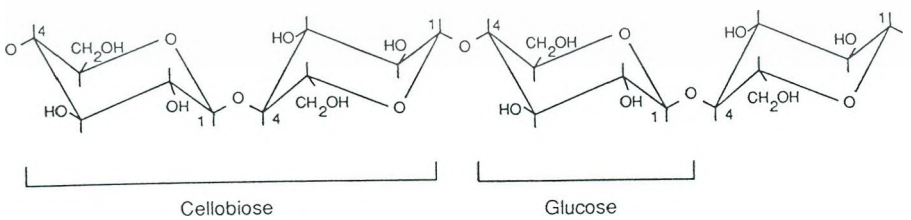
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจเอกสาร

1. เซลลูโลส (Cellulose)

1.1 ลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลส

เซลลูโลส (Cellulose) เป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่ง พบมากที่สุดในธรรมชาติ ประกอบด้วยหน่วยย่อยของเซลโลไบโอส (cellobiose) หรือโมเลกุลของกลูโคส (glucose) เชื่อมต่อกันเป็นลูกโซ่ยาว ชนิดสายตรงไม่มีกิ่งก้าน พันธะไกลโคซิดิคที่ต่อระหว่างกลูโคสเป็นชนิด β (1-4) (Beguin and Aubert, 1992; Gong et al., 1999) (ภาพที่ 1) หนึ่งโมเลกุลของเซลลูโลสประกอบด้วยหน่วยย่อยของกลูโคสระหว่าง 100 ถึง 14000 หน่วยย่อย พันธะ β (1-4) ทำให้กลูโคสที่อยู่ต่อกันในสายลูกโซ่ของเซลลูโลสอัดตัวออกในแนวตรงได้ ทำให้สายของเซลลูโลสหลายสายมีโอกาสเข้ามาใกล้ชิดกัน เรียงตัวขนานกันและเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonds) เกิดโครงสร้างเป็นมัด (bundle) หรือเรียกว่าไมโครไฟบริล (microfibril) โดยโมเลกุลของน้ำไม่สามารถเข้าไปแทรกตัวอยู่ได้เลย ทำให้เซลลูโลสไม่ละลายน้ำ ไมโครไฟบริล ประกอบด้วยส่วนที่เป็นผลึก หรือ คริสตัลลีน (crystalline) ซึ่งมีการจัดเรียงโมเลกุลของเซลลูโลสอย่างเป็นระเบียบสูง และบริเวณอะมอร์ฟัส (amorphous) ซึ่งการจัดเรียงโมเลกุลของเซลลูโลสไม่เป็นระเบียบหรือเป็นระเบียบน้อยกว่า ทำให้อัตราการเกิดผลึก (degree of crystallinity) ของเซลลูโลสมีค่าแตกต่างกัน อยู่ระหว่าง 0 ซึ่งพบใน acid-swollen cellulose, soluble cellulose เช่น carboxymethylcellulose (CMC) จนเกือบเข้าใกล้ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบในเซลลูโลสที่แยกจากผนังเซลล์ของสาหร่าย *Valonia* (Beguin and Aubert, 1992)



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส

ที่มา: Beguin and Aubert (1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบเซลลูโลสในธรรมชาติเป็นโครงสร้างรวมตัวอยู่กับโพลีเมอร์ชนิดอื่นๆ เช่น เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เพ็คติน (pectin) และลิกนิน (lignin) ซึ่งให้ความแข็งแรงแก่ผนังเซลล์ของพืช (ประหยัด, 2542; Beguin and Aubert, 1992) โดยเซลลูโลสที่พบในธรรมชาติมี 2 ชนิด คือ เพคโตเซลลูโลส (pectocellulose) ซึ่งประกอบด้วยเซลลูโลสมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) โครงสร้างส่วนใหญ่ของลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วยเซลลูโลส รองลงมาคือ เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน (Gong et al., 1999) เซลลูโลสเป็นส่วนประกอบหลักในพืชทุกชนิด วัตถุเหลือทิ้งทางการเกษตร และป่าไม้ ของเสียต่างๆที่มีองค์ประกอบของเซลลูโลสในอาหาร เคมี และเชื้อเพลิง รวมทั้งโรงงานอุตสาหกรรมที่ใช้วัตถุดิบทางการเกษตร (Fogarty, 1983; Gong et al., 1999) ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบโดยประมาณของวัตถุดิบที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ

1.2 การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสซึ่งเป็นแหล่งวัตถุดิบ

การย่อยสลายเซลลูโลสที่พบในลิกโนเซลลูโลส ประกอบด้วยกระบวนการทางเคมี และชีวภาพ กระบวนการทางกายภาพ และเคมีที่ใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลส ได้แก่ การลดขนาดโดยใช้เครื่องมือ การใช้กรด การใช้ด่าง การใช้ไอน้ำ การทำให้โครงสร้างของไฟเบอร์แตก หรือการใช้ supercritical fluids รวมทั้งการใช้แสง เป็นต้น กระบวนการดังกล่าวไม่เหมาะสมในการย่อยสลายเซลลูโลส เนื่องจากต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง สำหรับวิธีการทางชีวภาพ เช่น การใช้จุลินทรีย์ในการย่อยสลายเซลลูโลส พบว่าเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพ ลักษณะการย่อยจะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ และไม่เป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม (Gong et al., 1999) การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสในเส้นใยของผนังเซลล์พืชในธรรมชาติโดยจุลินทรีย์ อาศัยการทำงานของระบบเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) และเฮมิเซลลูเลส (hemicellulase) ซึ่งพบในแบคทีเรีย โปรโตซัว และเชื้อราบางชนิด (Patterson, 1992) โดยเชื้อราและแบคทีเรียพบว่ามีบทบาทสำคัญ สามารถย่อยสลายเซลลูโลสในบริเวณคริสตัลลิน (crystalline cellulose) และใช้เป็นแหล่งของคาร์บอน และพลังงาน พบได้ในจุลินทรีย์หลายชนิดในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobes) และไม่มีออกซิเจน (anaerobes) ซึ่งทำงานร่วมกัน การย่อยสลายเซลลูโลสในสภาวะที่มีออกซิเจน จะได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ส่วนในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน จะได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซมีเทนและน้ำ (Beguin and Aubert, 1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของพืชและวัตถุดิบต่างๆที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ

ที่มา: Gong et al.(1999)

Materials	Cellulose (%)	Hemicellulose (%)	Lignin (%)
Softwood			
Spruce	43	26	29
Pine	44	26	29
Hardwood			
Aspen	46	26	18
Black locust	49	21	22
Birch	38	27	23
Hybrid poplar	43	21	26
Red oak	38	27	23
Silver maple	46	23	21
Sycamore	44	22	23
Willow	37	23	21
Crop residues			
Corn cobs	45	35	15
Corn stalks	35	25	35
Corn stover	41	21	17
Sugar cane bagasse	40	30	20
Wheat strew	36	28	29
Others			
Alfalfa hay	38	9	14
Nut shells	25	25	30
Cotton	90	5	0
Cellulose Wastes			
Paper	85	0	15
Newspaper	61	16	21
Sorted refuse	60	20	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เซลลูเลส (Cellulases)

เอนไซม์เซลลูเลส ประกอบด้วยกลุ่มของเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะ β (1-4) ไกลโคซิดิคในเซลลูโลส และสารประกอบของเซลลูโลส เอนไซม์เซลลูเลสพบได้ในจุลินทรีย์หลายชนิด ซึ่งมีความสามารถในการสร้าง และระบบเซลลูเลสที่แตกต่างกัน (Beguin and Aubert, 1992)

2.1 ระบบเซลลูเลส (Cellulotytic systems)

เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ผสม ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ชนิดทำงานร่วมกัน คือ (Patterson, 1992; Moat and Foster, 1995; Gong et al., 1999)

1. Endo - β -1,4 glucanases หรือ Cx หรือ CMCase หรือ β -1,4 glucan glucanohydrolase (EC.3.2.1.4)

เป็นเซลลูเลสที่ย่อยสลายพันธะในเซลลูโลส หรืออนุพันธ์ของเซลลูโลสที่ละลายน้ำได้ เช่น carboxymethylcellulose (CMC) โดยย่อยสลายโพลีเมอร์ภายในสายอย่างอิสระได้ ผลผลิตเป็นโอลิโกเมอร์และกลูโคส (glucose)

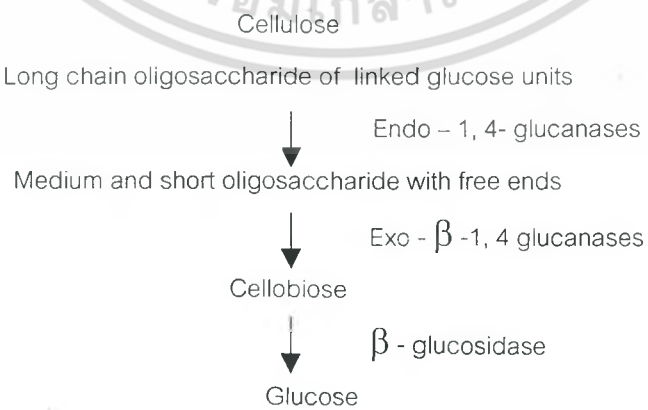
2. Exo - β -1, 4 glucanases หรือ C1 หรือ Cellobiohydrolases หรือ β -1,4 glucan cellobiohydrolase (EC.3.2.1.91)

ย่อยสลายสายโพลีเมอร์จากปลายสายด้านไม่มีหมู่รีดิวซ์ไปอย่างมีระเบียบ ได้ผลผลิตเป็นเซลโลไบโอส (cellobiose) และกลูโคส

3. β - glucosidase หรือ Cellobiases หรือ β -1,4 glucosidase (EC.3.2.2.21)

ย่อยสลายเซลโลไบโอส และเซลลูโลเดกตริน (cellulodextrins) ผลผลิตที่ได้ คือ กลูโคส

การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายเซลลูโลส แสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์

ที่มา: Moat and Foster (1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระบบของเอนไซม์เซลลูเลสดังกล่าวข้างต้น เกิดขึ้นภายนอกเซลล์จุลินทรีย์โดยเซลลูเลสจะถูกส่งออกมาจากเซลล์ และอยู่ในอาหาร ซึ่งพบได้ในเชื้อรา *Trichoderma reesei*, aerobic fungi และแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลส (Beguin and Aubert, 1992) อย่างไรก็ตามมีรายงานพบว่าระบบของเอนไซม์มีเกิดขึ้นได้ภายในผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ ซึ่งพบได้ในแบคทีเรีย *Clostridium thermocellum* (Beguin and Aubert, 1992; Moat and Foster, 1995)

2.2 ประโยชน์ของเซลลูเลส

เอนไซม์เซลลูโลส สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน ดังนี้

1. การผลิตเชื้อเพลิงและสารเคมี

ผลผลิตจากการย่อยสลายวัตถุดิบธรรมชาติที่ประกอบด้วยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูโลส คือ กลูโคส ซึ่งสามารถเปลี่ยนให้เป็นแอลกอฮอล์ อะซิโตน และกรดไขมันโดยอาศัยกระบวนการหมัก ซึ่งนำมาใช้เป็นแหล่งเชื้อเพลิงทดแทนน้ำมันและสารเคมีได้ (Beguin and Aubert, 1992)

2. อุตสาหกรรมอาหาร

ในกระบวนการแปรรูปอาหารใช้เอนไซม์เซลลูเลสในการทำให้เปลือกผลไม้นิ่ม และเพิ่มการเก็บเกี่ยวน้ำมัน และน้ำผลไม้ (Beguin and Aubert, 1992) ช่วยแยกส่วนเนื้อหยาบของผลแพร์ แยกเปลือกของผลอะปริคอต และผลมะเขือเทศ ช่วยสลายเซลลูโลสในระหว่างการทำเมล็ดกาแฟให้แห้ง (ปราณี, 2533)

3. อาหารสัตว์

เซลลูเลสใช้ในการเตรียมอาหารสัตว์ โดยย่อยสลายส่วนประกอบของเส้นใยพืชอาหารสัตว์เพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหารสัตว์ (Beguin and Aubert, 1992)

4. ผลิตภัณฑ์ผงซักฟอก

ในผลิตภัณฑ์ผงซักฟอก พบว่าเซลลูเลสใช้ขยายเส้นใยของเซลลูโลสของผ้า ทำให้เอนไซม์เข้าสู่เนื้อผ้า และทำให้สิ่งสกปรกหลุดจากเนื้อผ้าได้ดีขึ้น (ปราณี, 2533)

3. จุลินทรีย์ในกระเพาะส่วนต้นสัตว์เคี้ยวเอื้อง

สัตว์เคี้ยวเอื้อง (Ruminant) มีความสามารถพิเศษในการใช้อาหารหยาบ (roughage) กระเพาะของสัตว์เหล่านี้แบ่งออกเป็น 4 ส่วน คือ กระเพาะหมักหรือผ้าขี้ริ้ว (rumen) รังผึ้ง (reticulum) สามสิบกลีบ (omasum) และกระเพาะจริง (abomasum) ดังแสดงในภาพที่ 3 กระเพาะส่วนต้นสัตว์เคี้ยวเอื้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรือกระเพาะรูเมน (rumen) หรือกระเพาะหมักหรือผ้าขี้ริ้ว กระเพาะส่วนนี้มีปริมาตรความจุถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ของกระเพาะทั้งหมด อยู่ติดผนังด้านซ้ายของช่องท้อง (ภาพที่ 3) กระเพาะรูเมนจะมีจุลินทรีย์จำนวนมาก จุลินทรีย์จะทำหน้าที่ย่อยอาหารหมักที่สัตว์กินเข้าไป (เมธา, 2533)

จุลินทรีย์ในกระเพาะส่วนต้นสัตว์เคี้ยวเอื้องหรือกระเพาะรูเมน ส่วนใหญ่เป็นพวก obligate anaerobes คือจะอยู่ได้ในที่มีออกซิเจนอยู่บ้าง แต่ถ้ามีออกซิเจนมากเกินไปจะเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ (เมธา, 2533) จุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนประกอบด้วยโปรคารีโอต (แบคทีเรีย และ anaeroplasma) archaeobacteria (methanogens) ยูคารีโอต (cilate protozoa และเชื้อรา) และ bacteriophage จำนวนจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนพบว่ามีมากกว่าในระบบนิเวศอื่นๆ โดยมีจำนวนแบคทีเรียประมาณ 10^{10}-10^{11} เซลล์ต่อกรัม โปรโตซัว 10^{5}-10^{6} เซลล์ต่อกรัม และสปอร์ของเชื้อรา 10^{3}-10^{5} สปอร์ต่อกรัม ตามลำดับ (Patterson, 1992) โดยแบคทีเรียพบว่าซึ่งมีความสำคัญยิ่งในการทำงานในรูเมน (เมธา, 2533)

1. esophagus
2. cardia
3. esophageral groove
4. rumen
5. reticulum
6. omasum
7. abomasum
8. anterior pillar of rumen
9. diaphramg
10. reticulo - omasal orifice

ภาพที่ 3 ลักษณะรูปร่างของระบบทางเดินอาหารแบบ *in situ*
ที่มา: เมธา (2533)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1 แบคทีเรียในรูเมน

แบคทีเรียในรูเมนส่วนใหญ่เป็นพวก obligate anaerobes แต่อาจพบ facultative anaerobes เกิดขึ้นได้ ซึ่งติดมากับอาหารและน้ำแล้วผ่านออกจากกระเพาะรูเมนกับอาหารที่ถูกย่อยสลายแล้ว (Patterson, 1992) ชนิดของแบคทีเรียในรูเมนแสดงในตารางที่ 2

การแบ่งชนิดของแบคทีเรียในรูเมนสามารถทำได้หลายแบบ สามารถแบ่งกลุ่มแบคทีเรียออกตามการใช้ประโยชน์ของอาหารหรือผลผลิตที่สังเคราะห์ได้ดังนี้ (เมธา, 2533)

1. แบคทีเรียที่ใช้เซลลูโลส (Cellulolytic bacteria)

แบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) ซึ่งย่อยสลายเซลลูโลส นอกจากนี้อาจสามารถย่อยเซลโลไบโอส (cellobiose) ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 2 ตัวจับกันด้วยพันธะ β (1-4) แบคทีเรียกลุ่มนี้มีมากที่สุดในกระเพาะของสัตว์ที่ได้รับอาหารหยาบเป็นหลัก ชนิดที่สำคัญมี *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *R. albus* และ *Cillobacterium cellulosolvens* เป็นต้น

2. แบคทีเรียที่ใช้เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose digesting bacteria)

โดยปกติแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสจะสามารถย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสได้ด้วย แต่แบคทีเรียที่ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสจะไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ ชนิดที่สำคัญมี *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Lachnosperia multiparens* และ *Bacteroides ruminicola* เป็นต้น

3. แบคทีเรียที่ใช้อะไมเลส (Amylolytic digesting bacteria)

แบคทีเรียพวกนี้มีเป็นจำนวนมากในกระเพาะสัตว์ที่ได้รับอาหารข้นพลังงานสูง ซึ่งมีอะไมเลสเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ ชนิดที่สำคัญมี *Bacteroides amylophilus*, *Succinimonas amylophilus*, *Butyrivibrio fibrisolveens*, *Selenomonas ruminantium*, *Streptococcus bovis* และ *Bacteriodes ruminicola* เป็นต้น

4. แบคทีเรียที่ใช้กรด (Bacteria utilizing acids)

มีแบคทีเรียหลายสปีชีส์ที่สามารถใช้กรดต่างๆได้ เช่น *Veillonella gazogenes*, *V.alacalescens*, *Propionibacterium sp.*, *Selenomonas ruminantium*, *Peptostreptococcus elsdenii* และ *Selenomonas lactilytica* เป็นต้น

5. แบคทีเรียที่ใช้โปรตีน (Proteolytic bacteria)

แบคทีเรียหลายสปีชีส์ที่ใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งพลังงานพื้นฐาน มีหลายชนิดคือ *Bacteroides amylophilus*, *Clostridium sporogens* และ *Bacillus licheniformis* เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 ชนิดของแบคทีเรียในรูเมน[a]

1. Spirochetes
   - Order: Spirochaetales
     - Family: Spirochaetaceae
       - Genus: Treponema (bryantii, saccharophilum)
2. Anaerobic gram-negative straight, curved, and helical rods
   - Family: Bacteroidaceae
     - Genus: Anaerovibrio (lipolytica)
     - Genus: Bacteroides (ruminicola [ruminicola, brevis[b]], succinogenes, [succinogenes, Elongata[b]], amylophilus[b])
     - Genus: Selenomonus (ruminantium [ruminantium, lactilytica])
     - Genus: Succinimonas (amylolytica)
     - Genus: Succinivibrio (dextrinosolvens)
     - Genus: Wolinella (succinogenes)[c]
3. Anaerobic gram- negative cocci
   - Family: Vellonellaceae
     - Genus: Magasphaera (elsdenii)
     - Genus: Veillonella (parvula)[c]
4. Mycoplasmas
   - Order: Mycoplasmatales
     - Genus: Anaeroplasma (bactoclasticum, abactoclasticum)
5. Gram- positive cocci
   - Genus: Ruminococcus (albus, flavefaciens, bromii)
   - Genus: Streptococcus (bovis)
6. Regular, nonsporing, gram- positive rods
   - Genus: Lactobacillus (ruminis, vitulinus)
7. Irregular, nonsporing, gram- positive rods
   - Genus: Butyrivibrio (fibrisolvens)
   - Genus: Eubactrium (ruminantium, limosum, cellulosolvens[c], oxidoreducens)
   - Genus: Lachnospira (multiparus)
8. Archaeobacteria
   - Group: Methanogenic Archaeobacteria
     - Order: Methanobacteriales
       - Family: Methanobacteriaceae
         - Genus: Methanobrevibacter (ruminantium)
     - Order: Methanomicrobiales
       - Family: Methanosarcinaceae
         - Genus: Methanosarcina (barkeri)

[a] Predominant species are listed in parentheses; subspecies are listed in brackets.

[b] Have recently been renamed *Prevotella ruminicola*, *Fibrobacter succinogenes* (*Fibrobacter intestinalis* has recently been described), and *Ruminobacter amylophilus*, respectively.

[c] Originally named *Vibrio succinogenes*, *Veillonella alcalescens*, and *Cillobacter cellosolvens*, respectively.

ที่มา: Patterson (1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. แบคทีเรียที่ผลิตแอมโมเนีย (Ammonia-producing bacteria)

แบคทีเรียที่ผลิตแอมโมเนีย ได้แก่ *Bacteroides ruminicola*, *Selenomonas ruminatium*, *Peptostreptococcus elsdenii* และบางสายพันธุ์ของ *Butyrivibrio*

7. แบคทีเรียที่ผลิตมีเทน (Methanogenic bacteria)

ชนิดที่สำคัญมี *Methanobacterium ruminatium* และ *M. formicium* เป็นต้น มีรายงานว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถจัดอยู่ในกลุ่มของ archaeobacteria (Patterson, 1992)

8. แบคทีเรียที่ใช้ไขมัน (Lipolytic bacteria)

แบคทีเรียหลายชนิดที่มีความสามารถในการใช้กลีเซอรอล และย่อยกลีเซอรอลจากโมเลกุลของไขมัน อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบเป็นที่แน่นอนว่าเป็นสปีชีส์ใดที่มีความสามารถเฉพาะเช่นนั้น

9. แบคทีเรียที่สังเคราะห์วิตามิน (Vitamim-synthesizing bacteria)

ยังไม่มีการศึกษาถึงแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์วิตามินอย่างจริงจัง ถึงแม้ว่าจะทราบว่ามีแบคทีเรียหลายสปีชีส์ที่สามารถสังเคราะห์วิตามินบีรวมรวมได้

ปัจจุบันนี้ได้มีการเปลี่ยนแปลงชื่อของแบคทีเรียที่พบในกระเพาะรูเมน ดังนี้ *Bacteroides succinogenes* เปลี่ยนชื่อเป็น *Fibrobacter succinogenes*, *Bacteroides amylophilus* เปลี่ยนชื่อเป็น *Ruminobacter amylophilus* และ *Vibrio succinogenes* เปลี่ยนชื่อเป็น *Wolinella succinogenes* (Patterson, 1992)

3.2 โปรโตซัว

โปรโตซัวมีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรีย ซึ่งสามารถมองเห็นด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา โปรโตซัวในรูเมนสามารถใช้โปรตีนเป็นแหล่งอาหารสำคัญ และใช้คาร์โบไฮเดรต จาก น้ำตาล แป้ง เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส เป็นแหล่งพลังงานได้ โปรโตซัวส่วนใหญ่เป็นพวกมีขน (ciliated protozoa) แต่มีบางสปีชีส์เป็น flagellated protozoa ซึ่งพบในกระเพาะรูเมนของสัตว์ในระยะแรกเกิดเท่านั้น ความสำคัญของโปรโตซัวในกระเพาะรูเมน นับว่ามีน้อยกว่าในแบคทีเรีย (เมธา, 2533) ชนิดของโปรโตซัวในรูเมนแสดงในตารางที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ชนิดของโปรโตซัวในรูเมน

Phylum: Ciliophora

Subphylum: Rhabdophora

Class: Litostomatea

Subclass: Trichostomatia

Order: Vestibuliferida

Family: Isotrichidae

Genus: Dasytricha (ruminantium)

Genus: Isotricha (intestinalis, prostoma)

Genus: Oligoisotricha (bubali)

Order: Entodinimorphida

Suborder: Blepharocorythina

Family: Blepharocorythidae

Genus: Charonina (ventriculi, equi, nuda)

Suborder: Archistomatina

Family: Buetschliidae

Genus: Buetschlia (parva, neglecta, lanceolata, triciliata)

Genus: Parabundleia (ruminantium)

Genus: Polymorphella (bovis)

Genus: Blepharoconus (krugerensis)

Suborder: Entodiniomorphina

Family: Ophryoscolecidae

Subfamily: Entodiniinae

Genus: Campylodinium (ovum-ragae)

Genus: Entodinium (bursa, caudatum, simplex)[a]

Subfamily: Diplodiniinae

Genus: Diplodinium (dentatum)[a]

Genus: Eodinium (lobatum, rectangulatum)[a]

Genus: Eremoplastron (rostratum, bovis)

Genus: Eudiplodinium (maggii)

Genus: Diploplastron (affine)

Genus: Polyplastron (multivesiculatum)

Genus: Elytroplastron (bulbali)

Genus: Metadinium (medium, ypsilon, tauricum)[a]

Genus: Ostracodinium (mammosum, dentatum)[a]

Genus: Enoploplastron (triloricatum)

Subfamily: Ophryoscolecinae

Genus: Epidinum (ecaudatum)[a]

Genus: Epiplastron (africanum)

Genus: Ophryoscolex (purkynjei, caudatus)

[a] Genus contains a number of additional species or forms. The type species is given first.

ที่มา: Patterson (1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 เชื้อรา

กลุ่ม anaerobic fungi ทำหน้าที่เกี่ยวกับการหมักการย่อยอาหารในรูเมน โดยพบว่าเชื้อราเหล่านี้ฝังตัวอยู่ในเยื้อใยของอนุภาคอาหาร และเชื่อว่ามีส่วนช่วยในการย่อยสลายเซลลูโลส (เมธา, 2533) ชนิดของเชื้อราที่พบในรูเมนแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ชนิดของเชื้อราในรูเมน

Division: Eumycota	
Subdivision: Mastigomycotina	
Class: Chytridiomycetes	
Order: Spizellomycetales	
Family: Neocallimasticaceae	
Genus: Neocallimastix (frontalis, patriciarum, joyonii)	
Genus: Caecomyces (communis)	
Genus: Piromyces(communis)	
Unaffiliated Genera	
Genus: Orpinomyces (bovis)	
Genus: Ruminomyces (elegans)	

ที่มา: Patterson (1992)

3.4 Bacteriophage

การศึกษาเกี่ยวกับ phage ในกระเพาะรูเมนมีเมื่อไม่นานมานี้ ซึ่งมีรายงานการศึกษาน้อยมาก จำนวน phage ในรูเมน พบสูงถึง 10^7-10^8 phage ต่อมิลลิลิตรของของเหลวในรูเมน (rumen fluid) ชนิดของ phage ที่พบมีมากกว่า 125 ชนิด (Patterson, 1992)

4. การแยกเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสจากธรรมชาติ

การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะในกลุ่มของเชื้อรา และแบคทีเรีย การศึกษาได้ทำการแยก และคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสจากแหล่งธรรมชาติต่างๆ การศึกษาสูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ และการนำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม การศึกษาการแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสจากธรรมชาติ มีดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พิพัฒน์ (2527) ได้ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสจากกระเพาะวัว ได้เชื้อแบคทีเรียทั้งสิ้น 113 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ที่สามารถที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้คือ สายพันธุ์ CU1, CU3 และ CU4 พบว่าทั้งแบคทีเรียสามสายพันธุ์ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน และเมื่อย่อยสลายเซลลูโลสแล้วจะได้ อะซิเตท ซัคซิเนท ก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

Hungate (1947) ได้ทำการศึกษา และคัดแยกเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสจาก rumen content ของวัว พบเชื้อแบคทีเรีย รูปร่างกลม (coccus) และท่อน (rod) หลายชนิดโดยแบคทีเรียรูปร่างกลม อยู่ในจีนัส *Streptococcus* sp.

Dehority (1963) ทำการแยกและศึกษาลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลส 4 สายพันธุ์ จากการหมักรูเมนในหลอดทดลอง พบเชื้อ *Bacteroides succinogenes* (A3C และ B21a) และ *Ruminococcus flavefaciens* (B34b และ C1a)

Benoit et al.(1992) ได้แยกเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสในสภาวะไม่มีอากาศจากขยะจากเทศบาล เมื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและปฏิกิริยาชีวเคมีของแบคทีเรีย พบเชื้อ *Clostridium* sp. หลายชนิด ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้สูง และย่อยกระดาษได้

Fondevila และ Dehority (1994) ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavetaciens* และ *Prevolella ruminicola* จากรูเมน และทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสที่ได้จากป่าไม้ พบว่าแบคทีเรียเหล่านี้สามารถใช้ประโยชน์จากเฮมิเซลลูโลสได้

Foong et al. (1997) ได้ทำการแยกและศึกษาลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสจากกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยงเอื้องในประเทศแคนนาดา ญี่ปุ่น อาร์เจนตินา และมาเลเซียโดยใช้วิธี cellulose enrichment พบเชื้อ *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavetaciens* และ *Butyrivibrio* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารที่ใช้ในเลี้ยง และแยกเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลส ได้แก่ อาหารสูตร rumen fluid cellulose broth (RFCB), rumen fluid cellulose agar (RFCA), Mc Beth's cellulose ammonium sulfate, Petterson's media และ nutrient agar (NA) ส่วนประกอบของสูตรอาหารต่างๆ แสดงในภาคผนวก ก.

2. แหล่งของเชื้อจุลินทรีย์

ตัวอย่างหญ้าหมักจากกระเพาะส่วนต้น หรือกระเพาะรูเมนวัวพันธุ์ผสมระหว่าง Holspyl Fresian และ Brahman จากคอกเลี้ยงสัตว์ของภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3. การเก็บและเตรียมตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างหญ้าหมักจากวัว 3 ตัว ในช่วงเวลา 7.00-8.00 น. ก่อนการให้อาหาร โดยเปิดฝาด้านข้างที่มีการผ่าตัดเจาะทำเป็นช่องแคนนูลา (cannula) นำตัวอย่างหญ้าหมักของวัวทั้ง 3 ตัว ใส่ในขวดปลอดเชื้อ ผสมให้เข้ากัน ปั่นด้วยเครื่อง blender เป็นเวลา 3 นาที ทำการแยกตัวอย่างของเหลว (rumen fluid) โดยการบีบตัวอย่างหญ้าหมักผ่านผ้าขาวบาง 4 ชั้น เก็บตัวอย่างไว้ในขวดปลอดเชื้อ

4. การแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส

การแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสจากของเหลวจากกระเพาะส่วนต้นของวัว มีหลายวิธีดังนี้

วิธีที่1 นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร rumen fluid cellulose broth (RFCB) (ภาคผนวก ก.) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง เททับด้วยพาราฟินเหลวปลอดเชื้อ นำไปบ่มในตู้บ่มไร้อากาศ (anaerobic jar) อุณหภูมิ 37-39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ลูปแตะเชื้อในหลอดทดลอง ขีด (streak) บนอาหารแข็งสูตร rumen fluid cellulose agar (RFCA) (ภาคผนวก ก.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำนวน 5 จาน ทำการบ่มเชื้อในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน อุณหภูมิ 37-39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ คัดเลือกโคโลนีที่เกิดจากเซลล์เดี่ยว

วิธีที่ 2 นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร Mc Beth's cellulose ammonium sulfate ที่มีกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เป็นแหล่งของเซลลูโลส ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ในหลอดอาหาร เลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน โดยในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ให้เททับด้วยพาราฟินเหลวปลอดเชื้อ บ่มเชื้อในตู้บ่ม อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ นำหลอดอาหารที่พบการย่อยของกระดาษกรอง มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Petterson's media โดยใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส คัดเลือกโคโลนีที่เกิดจากเซลล์เดี่ยว

วิธีที่ 3 นำตัวอย่าง มาขีด (streak) เชื้อลงในอาหาร Petterson's media โดยใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส ทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มี และไม่มีออกซิเจน อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน คัดเลือกโคโลนีที่เกิดจากเซลล์เดี่ยว

เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ นำมาแยกและเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Petterson's media โดยใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส เพื่อให้ได้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์

5. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส

5.1 การคัดเลือกขั้นที่หนึ่ง ตามวิธีการของ Hankin และ Anagostakis (1977)

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากข้อ 4 มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร carboxymethylcelluose (CMC agar) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ราดทับด้วย congo red ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ล้างออกด้วย 1 M NaCl แยกเอาเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่เกิดวงใส (clear zone) ออกมา

5.2 การคัดเลือกขั้นที่สอง

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.1 มาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร Petterson's media โดยใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ถ่ายเชื้อ 1 ลูป ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลวที่มี carboxymethylcelluose (CMC) 1.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปอร์เซ็นต์ และประกอบด้วย peptone 0.5 เปอร์เซ็นต์ KH_2PO_4 0.5 เปอร์เซ็นต์ $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ แล yeast extract 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน นำไปเข้าเครื่องเซนติฟิวส์ ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) เพื่อใช้เป็น crude enzyme นำมาหากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ภาคผนวก ข.) คัดเลือกเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ได้สูงไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

6. การจำแนกสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย

ทำการเลี้ยงและเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียในอาหารแข็งสูตร nutrient agar (NA) และจำแนกสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย ดังนี้

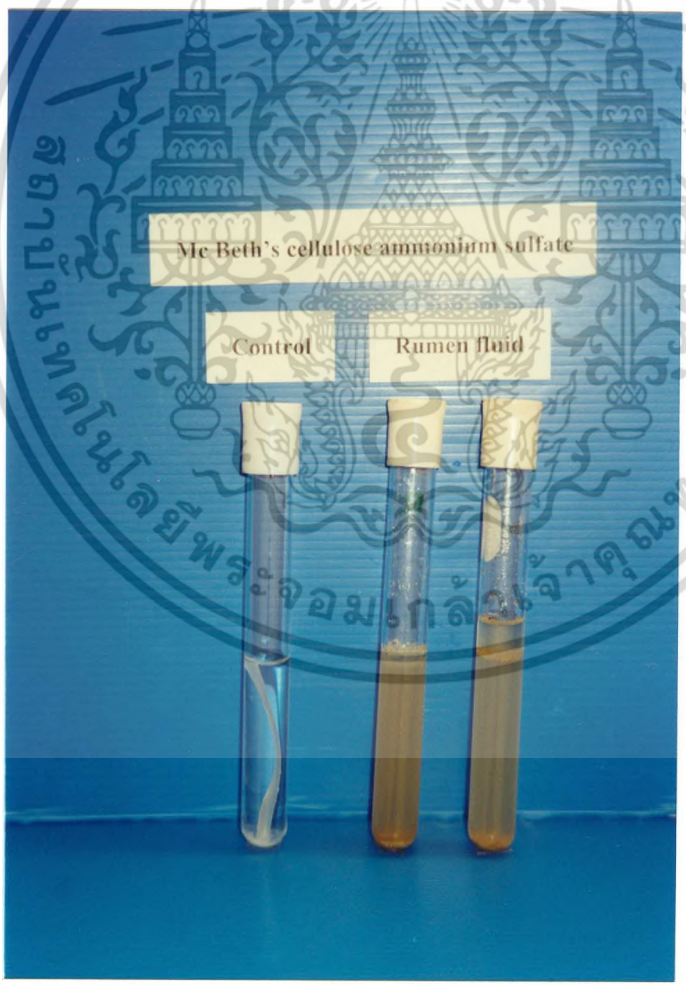
1. ตรวจดูรูปร่างลักษณะของโคโลนีบนอาหาร ลักษณะการติดสีแกรม และการสร้างสปอร์
2. ศึกษาสมบัติทางชีวเคมีต่างๆ
3. จำแนกชนิดของแบคทีเรียตาม Bergry's manual (Krieg, 1984; Sneath, 1986; Holt, 1994) และเอกสารอ้างอิงที่เกี่ยวข้อง (ดวงพร, 2537; นันทนา, 2537; 2538)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
100984

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส

การแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างของเหลวในกระเพาะส่วนต้นวัว (rumen fluid) โดยนำมาเลี้ยงในอาหารที่องค์ประกอบของเซลลูโลส 3 วิธี จุลินทรีย์เจริญได้ในอาหารทุกสูตร จากการทดลองมีการย่อยสลายกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เกิดขึ้น โดยจุลินทรีย์ในของเหลวจากกระเพาะส่วนต้นวัวในอาหาร Mc Beth's cellulose ammonium sulfate ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน (ภาพที่ 4) ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวๆในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้เชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 32 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 5, 6 และ 7 ตามลำดับ



ภาพที่ 4 การย่อยสลายกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ในอาหารเหลวสูตร Mc Beth's cellulose ammonium sulfate โดยจุลินทรีย์ในของเหลวจากกระเพาะส่วนต้นวัว (rumen fluid)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากของเหลวในกระเพาะส่วนต้นวัว บนอาหารสูตร rumen fluid cellulose agar (RFCA) ตามวิธีที่ 1 สภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน

สายพันธุ์	สีโคโลนีของแบคทีเรีย
1	ขาวขุ่น
2	ขาวขุ่น
3	เหลือง
4	น้ำตาล
5	ขาวขุ่น
6	เหลืองส้ม
7	เหลืองอ่อน
8	เหลืองขุ่น
9*	เทา
10*	เหลือง
11*	ขาว
12*	ขาวเทา
13*	ใส
14*	เหลืองขุ่น
15*	ส้ม
16*	เหลืองขุ่น
17*	ไข่ไก่
18*	ขาวเหลือง

* สภาวะที่มีออกซิเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากของเหลวในกระเพาะส่วนต้นวัว ในอาหาร Mc Beth's cellulose ammonium sulfate ที่มีกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Petterson's media โดยใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส ตามวิธีที่ 2 สภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน

สายพันธุ์	สีโคโลนีของแบคทีเรีย
19	เหลืองขุ่น
20	ขาวเหลือง
21*	ขาวเหลือง
22*	ขาวเหลือง
23*	ขาว
24*	เหลืองขุ่น
25*	ขาวเหลือง
26*	ขาวเหลือง
27*	ขาวเหลือง
28*	เหลืองขุ่น
29*	ขาวเหลือง

* สภาวะที่มีออกซิเจน

ตารางที่ 7 เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากของเหลวในกระเพาะส่วนต้นวัว บนอาหารแข็งสูตร Petterson's media โดยใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส ตามวิธีที่ 3 สภาวะไม่มีออกซิเจน

สายพันธุ์	สีโคโลนีของแบคทีเรีย
30	ขาว
31	ขาว
32	ขาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีย่อยสลายเซลลูโลส

นำแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 1. มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร carboxymethylcellulose (CMC agar) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ราดทับด้วย congo red ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ล้างออกด้วย 1 M NaCl แยกเอาเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่เกิดวงใส (clear zone) ออกมา พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้มีการเกิดวงใสแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 8 ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่เกิดวงใสชัดเจนมีทั้งหมด 7 ไอโซเลท คือ สายพันธุ์ที่ 3, 21, 22, 23, 25, 29 และ 32 ตามลำดับ

ตารางที่ 8 การเกิดวงใสของแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสที่คัดเลือกแยกได้

สายพันธุ์	การเกิดวงใส[a]	สายพันธุ์	การเกิดวงใส[a]
1	+	17	++
2	+	18	-
3	+++	19	-
4	-	20	++
5	-	21	+++
6	d	22	+++
7	+	23	+++
8	-	24	-
9	d	25	+++
10	++	26	+
11	+	27	-
12	-	28	-
13	++	29	+++
14	++	30	+
15	++	31	+
16	+	32	+++

[a] _ ไม่เกิดวงใส, + แสดงความชัดของวงใส, d เชื้อไม่เจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ

3. การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้สูง

ทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในอาหารเหลวที่มี carboxymethylcellulose (CMC) 1.0 เปอร์เซ็นต์ และประกอบด้วย peptone 0.5 เปอร์เซ็นต์ KH_2PO_4 0.5 เปอร์เซ็นต์ $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ yeast extract 0.5 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้จากข้อ 2. พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ มีค่า carboxymethylcellulase (CMCase) อยู่ในช่วง 0.044 - 0.111 units/ml และให้ค่า CMCase เฉลี่ย 0.083 units/ml (ตารางที่ 9) คัดเลือกแบคทีเรียที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูง จำนวน 4 ไอโซเลท คือ สายพันธุ์ที่ 3, 25, 29 และ 32 ตามลำดับ

การสร้างเซลลูเลสของเชื้อที่คัดเลือกได้นี้ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *Clostridium* sp. ที่คัดเลือกได้จากการทดลองของ Benoit et al.(1992) พบว่าไม่แตกต่างกันมากนัก อย่างไรก็ตามสามารถศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับปรุงเชื้อให้ผลิตเอนไซม์ได้สูง ซึ่งอาจจะเป็นประโยชน์ต่อไป

ตารางที่ 9 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

สายพันธุ์	Carboxymethylcellulase (CMCase) acitivity (units/ml)
3	0.111
21	0.049
22	0.044
23	0.045
25	0.077
29	0.073
32	0.070

4. การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้

การศึกษารูปร่าง ลักษณะ การติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 4 ไอโซเลท พบว่าแบคทีเรียติดสีแกรมลบ รูปร่างท่อน จำนวน 3 ไอโซเลท และติดสีแกรมบวก รูปร่างท่อน จำนวน 1 ไอโซเลท ไม่สร้างสปอร์ และการศึกษาสมบัติทางชีวเคมีต่างๆของแบคทีเรียเหล่านี้ แสดงในตารางที่ 10 การวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรีย โดยเปรียบเทียบสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อที่คัดเลือกได้จากตารางที่ 10 กับ Bergry's manual (Krieg, 1984; Sneath, 1986; Holt, 1994) ได้ผลดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 10 ลักษณะ รูปร่าง และสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูเลสได้สูง

ลักษณะ/การทดสอบ	สายพันธุ์			
	9	25	29	32
Gram stain	+	-	-	-
Spore	-	-	-	-
Motility	-	+	-	+
Growth on MacConkey agar	-	+	+	-
Catalase	+	+	+	-
Oxidase	-	+	+	-
Indole production	-	-	-	-
Galatin liquefaction (15 days)	-	+	-	-
Starch hydrolysis	-	-	-	-
Nitrate reduction	-	-	-	ND
Hydrogen sulfide	-	+	+	-
Urease	+	+	-	-
Acid produced from:				
Fructose	+	+	-	+
Glucose	+	+	+	+
Lactose	-	+	-	+
Maltose	ND	+	-	ND
Mannitol	-	+	-	+
Mannose	ND	+	-	ND
Sucrose	+	+	-	+
Xylose	-	+	-	+
Production of gas from glucose	-	+	-	+
Oxidation – Fermentation (Glucose O/F)	+ / +	+ / +	+ / -	+ / +

ND: Not determined

สายพันธุ์ที่ 3 มีสมบัติทางชีวเคมีใกล้เคียงกับเชื้อ *Lachnospira multiparus*

สายพันธุ์ที่ 29 มีสมบัติทางชีวเคมีใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacteroides succinogenes*

สายพันธุ์ที่ 32 มีสมบัติทางชีวเคมีใกล้เคียงกับเชื้อ *Butyrivibrio fibrisolvens*

และ สายพันธุ์ที่ 25 ไม่สามารถวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียในการทดลองนี้เป็นเพียงการวิเคราะห์เบื้องต้นเท่านั้น เนื่องจากวิเคราะห์สมบัติทางเคมีบางประการเท่านั้นที่ศึกษาได้ ถ้าต้องการความถูกต้องแน่นอน ควรจะต้องมีการวิเคราะห์สมบัติอื่นๆเพิ่มเติมอีก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

จากการแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสจากของเหลวในกระเพาะส่วนต้นวัว โดยใช้อาหารที่มีองค์ประกอบของเซลลูโลส คือ rumen fluid cellulose, Mc Beth's cellulose ammonium sulfate และ Petterson's media ผลปรากฏว่าแยกเชื้อแบคทีเรียได้จำนวน 32 ไอโซเลท และเมื่อนำแบคทีเรียที่แยกได้ไปเลี้ยงในอาหาร carboxymethylcellulose (CMC agar) ทดสอบการเกิดวงใสหลังจากราดทับด้วย congo red พบเชื้อแบคทีเรียที่เกิดวงใสชัดเจนจำนวน 7 ไอโซเลท และเมื่อนำแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี carboxymethylcelluose (CMC) 1.0 เปอร์เซ็นต์ และประกอบด้วย peptone 0.5 เปอร์เซ็นต์ KH_2PO_4 0.5 เปอร์เซ็นต์ $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ yeast extract 0.5 เปอร์เซ็นต์ บ่มเชื้อในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน นำมาหากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส พบแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูง 4 ไอโซเลท คือ สายพันธุ์ที่ 3, 25, 29 และ 32 ตามลำดับ ซึ่งให้ค่า carboxymethylcellulase (CMCase) ได้ในช่วง 0.044-0.111 units/ml

การวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรีย 4 ไอโซเลท โดยศึกษารูปร่างลักษณะ และการติดสีแกรม พบแบคทีเรียติดสีแกรมลบ รูปร่างท่อน จำนวน 3 ไอโซเลท และติดสีแกรมบวก รูปร่างท่อน จำนวน 1 ไอโซเลท ไม่สร้างสปอร์ แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 3 มีสมบัติทางชีวเคมีใกล้เคียงกับเชื้อ *Lachnospira multiparus* สายพันธุ์ที่ 29 มีสมบัติทางชีวเคมีใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacteroides succinogenes* สายพันธุ์ที่ 32 มีสมบัติทางชีวเคมีใกล้เคียงกับเชื้อ *Butyrivibrio fibrisolvens* และ สายพันธุ์ที่ 25 ไม่สามารถวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียได้ สำหรับผลการศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อเหล่านี้ เมื่อเปรียบเทียบแล้วยังไม่สามารถวิเคราะห์สปีชีส์ได้อย่างแน่นอน เนื่องจากในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาสมบัติทางชีวเคมีบางประการเท่านั้น ดังนั้นถ้าต้องการทราบสปีชีส์ที่แน่นอนก็ควรวิเคราะห์สมบัติอื่นๆเพิ่มเติมอีก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ดวงพร คันธโชติ. 2537. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

นันทนา อรุณฤกษ์. 2537. การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

นันทนา อรุณฤกษ์. 2538. การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอนแอโรปส์. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

บุญทา วรินทร์รักษ์. ไม่ระบุปีที่พิมพ์. ปฏิบัติการบักเตรีวิทยาขั้นสูง. พิมพ์ครั้งที่ 2. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

ประหยัด โกมารทัต. 2542. คาร์โบไฮเดรต. ในภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, ชีวเคมี พิมพ์ครั้งที่ 2, หน้า 35-54. กรุงเทพมหานคร: หจก. จิรรัชการพิมพ์.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2535. เอนไซม์ทางอาหาร ตอนที่ 1. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พรเทพ ถนนแก้ว. 2538. ภาวะเหมาะสมของการผลิตเซลลูเลสจากเชื้อราที่คัดแยกจากบริเวณปลูกป่าศรนารายณ์ *Agave sisalana* Perrine. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พิพัฒน์ ศรีเบญจลักษณ์. 2527. การผลิตชีวก๊าซจากเซลลูโลสโดยใช้เชื้อคู่. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เมธา วรรณพัฒน์. 2533. โภชนศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง. กรุงเทพฯ: หจก. ฟันนี่พับบลิชชิ่ง.

สุวรรณา ภูวนวิทยาคม. 2528. แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยเศษพืช. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Beguin, P. and Aubert, J. - P. 1992. Cellulases. In J. Lederberg (ed.), Encyclopedia of microbiology, pp. 467-477. San Diego: Academic Press, Inc.

Benoit, L., Cailliez, C., Petitdemange, E., and Gitton, J. 1992. Isolation of cellulolytic mesophilic Clostridia from a municipal solid waste digestor. Microb. Ecol. 23: 117-125.

Dehority, B. A. 1963. Isolation and characterization of several cellulolytic bacteria from *in vitro* rumen fermentations. J. Dairy Sci. 46: 217-222.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dehority, B. A. 1991. Cellulose degradation in ruminants. In C.H. Haigler and P. J. Weimer (eds.), Biosynthesis and biodegradation of cellulose, pp. 327-354. New York: Marcell Dakker, Inc.

Fogarty, W.M. 1983. Microbial enzymes and biotechnology. London: Applied Science publishers.

Fondevila, M., and Dehority, B.A. 1994. Degradation and utilization of forage hemicellulose by rumen bacteria, singly in coculture or added sequentially. J. Appl. Bacteriol. 77 (5): 541-548.

Foong, F. C. F., et al. 1997. Selective isolation and characterization of cellulolytic bacteria by cellulose enrichment method from the rumen of ruminants. JIRCAS Journal No. 5: 79-89.

Gong, C. S., Cao, N., and Tsao. G. T. 1999. Organic compounds, cellulose conversion. In M. C. Flickinger and S. W. Drew (eds.), Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation Vol. 4, pp. 1895-1904. New York: John Wiley & Sons, Inc.

Hankin, L., and Anagnostakis, S. L. 1977. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect Cx cellulase activity of microorganism. J. Gen. Microbiol. 98: 109-115.

Holt, J. G. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th edition. Baltimore: Williams & Wilkins.

Hungate, R. E. 1947. Studies on cellulose fermentation III. The culture and isolation cellulose-decomposing bacteria from the rumen of cattle. J. Bacteriol. 53: 631-645.

Krieg, N. R. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology Vol. 1. Baltimore: Williams & Wilkins.

Moat, A. G., and Foster, J.W. 1995. Microbial physiology. 3rd edition. New York: Wiley-Liss, Inc.

Patterson, J. A. 1992. Rumen microbiology. In J. Lederberg (ed.), Encyclopedia of microbiology Vol. 3, pp. 623-642. San Diego: Academic Press, Inc.

Rapp, P., and Beermann, A. 1991. Bacterial cellulases. In C. H. Haigler and P. J. Weimer (eds.), Biosynthesis and biodegradation of cellulose, pp. 535-597. New York: Marcell Dakker, Inc.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sneath, P. H. A. 1986. Bergey's manual of systematic bacteriology Vol. 2. Baltimore: Williams & Wilkins.

Stutzenberger, F. 1990. Bacterial cellulases. In W.M. Fogarty and C.T. Kelly (eds.), Microbial enzymes and biotechnology, 2nd edition, pp. 37-70. London: Elsevier Applied Science Ltd.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Carboxymethylcellulose agar (Hankin and Anagnostakis, 1977)

$(NH_4)_2SO_4$	1.0	กรัม
Carboxymethylcelluose	5.0	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
Agar	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลาย carboxymethylcellulose (CMC) ในน้ำอุ่น 500 มิลลิลิตร โดยใส่ CMC ที่ละน้อย พร้อมกับการคนตลอดเวลา จนกระทั่ง CMC ละลายหมด ละลายส่วนผสมที่เหลือแล้วเติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

Inorganic salt solution (Hungate buffer) (พิพัฒน์, 2527)

$(NH_4)_2SO_4$	1.25	กรัม
$NaHPO_4.12H_2O$	44.09	กรัม
KH_2PO_4	11.18	กรัม
$CaCl_2$	0.125	กรัม
$MgSO_4$	0.125	กรัม
NaCl	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

Nutrient agar

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mc Beth's cellulose ammonium sulfate solution (บุญทา, ไม่ระบุปีที่พิมพ์)

Dipotassium phosphate	1.0	กรัม
Magnesium sulfate	1.0	กรัม
Sodium carbonate	1.0	กรัม
Ammonium sulfate	2.0	กรัม
Calcium carbonate	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ที่ตัดเป็นชิ้น ขนาด 1.0 x 5.0 เซนติเมตร

นำส่วนผสมแต่ละอย่างละลายในน้ำกลั่น แล้วเทใส่หลอดทดลอง ที่ใส่กระดาษกรองไว้ก่อน ขณะที่เทแบ่งใส่หลอดทดลองให้เขย่าส่วนผสมก่อน เพื่อไม่ให้ calcium carbonate ตกตะกอน แล้วนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 30 นาที

Petterson's media (สุวรรณา, 2528)

ใช้ผงเซลลูโลสเป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอนแทนกลูโคส

Cellulose power	6.0	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	2.0	กรัม
KH_2PO_4	0.6	กรัม
K_2HPO_4	0.4	กรัม
$MgSO_4 . 7H_2O$	0.5	กรัม
Ferric citrate	10.0	มิลลิกรัม
$ZnSO_4 . 7H_2O$	4.4	มิลลิกรัม
$MnSO_4 . 4H_2O$	5.0	มิลลิกรัม
$CaCl_2$	55.0	มิลลิกรัม
$CoCl_2 . 6H_2O$	1.0	มิลลิกรัม
Thiamine hydrochloride	100.0	มิลลิกรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
Agar	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rumen fluid cellulose broth (RFCB) (พิพัฒน์, 2527)

สูตรในหน่วยมิลลิลิตร และกรัม ต่ออาหาร 0.5 ลิตร

Inorganic salt solution	200	มิลลิลิตร
Resazurin (0.1% solution)	0.5	มิลลิลิตร
Rumen fluid	7.5	มิลลิลิตร
Cellulose	0.5	กรัม
Cysteine hydrochloride	0.05	กรัม
น้ำกลั่น	224.5	มิลลิลิตร

ปรับ pH 7.0

Rumen fluid cellulose agar (RFCA) (พิพัฒน์, 2527)

องค์ประกอบในหน่วยมิลลิลิตร และกรัม ต่ออาหาร 0.5 ลิตร

Inorganic salt solution	200	มิลลิลิตร
Resazurin (0.1% solution)	0.5	มิลลิลิตร
Rumen fluid	7.5	มิลลิลิตร
Cellulose	7.0	กรัม
Cysteine hydrochloride	0.05	กรัม
Agar	7.5	กรัม
น้ำกลั่น	224.5	มิลลิลิตร

ปรับ pH 7.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

การเตรียมสารเคมี

Congo red 0.1 เปอร์เซ็นต์

ชั่ง Congo red 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

การหากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส

โดยการวิเคราะห์หากิจกรรมของ carboxymethylcellulase (CMCase) ตามวิธีการดัดแปลงของพรเทพ (2538)

1. นำ crude enzyme มา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดสอบ
2. เติม 0.1 M citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และเติม CMC 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
3. นำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
4. เติมสารละลาย DNS reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
5. เติมน้ำกลั่นในหลอดทดลอง 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เทียบกับหลอดควบคุม จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส จากกราฟมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่า unit of enzyme

การเตรียมสารละลาย DNS (Dinitrosalicylic acid)

1. เตรียมสารละลาย NaOH 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 22 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในสารละลาย phenol 10 กรัม เติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน เทแบ่งออกมา 96 มิลลิลิตร เติม $NaHSO_3$ 9.6 กรัม คนให้เข้ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เติมสารละลาย DNS 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 880 มิลลิลิตร และเตรียมสารละลาย Rochell salt 255 กรัม ด้วยสารละลาย NaOH 4.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเทรวมกับสารละลาย DNS 1 เปอร์เซ็นต์ คนให้เข้ากัน
3. นำสารละลายที่ได้จากข้อ 1 และ 2 มาเทรวมกัน จะได้สารละลาย DNS เก็บไว้ในขวดสีชา แล้วนำเข้าตู้เย็นก่อนอย่างน้อย 1 คืน จึงนำมาใช้ได้

การทำกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

1. เตรียมสารละลายกลูโคสที่มีความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.4 ,0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นใส่ลงในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลาย DNS ลงไปหลอดละ 3 มิลลิลิตร นำไปตั้งในน้ำเดือด นาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น
3. เติมน้ำกลั่นลงไปทุกหลอดๆละ 10 มิลลิลิตร
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟระหว่างค่า optical density (OD) กับปริมาณน้ำตาลกลูโคส ดังแสดงในภาพที่ 5

การคำนวณหาค่า unit of enzyme

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ คือปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายซับสเตรทให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ใช้ทดสอบ (พรเทพ, 2538; Benoit et al., 1992)

นั่นคือ

1 หน่วยของเอนไซม์ = 1 u mole ของซับสเตรทที่ถูกย่อยในเวลา 1 นาที

= 1 u mole ของกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมาในเวลา 1 นาที

= 0.180 มิลลิกรัมกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมาในเวลา 1 นาที

ถ้า 0.180 มิลลิกรัมกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมาในเวลา 1 นาที มีค่า 1 หน่วย

1.000 มิลลิกรัมกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมาในเวลา 10 นาที มีค่า $\frac{1}{(0.180 \times 10)}$ หน่วย

มีค่า 0.555 หน่วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

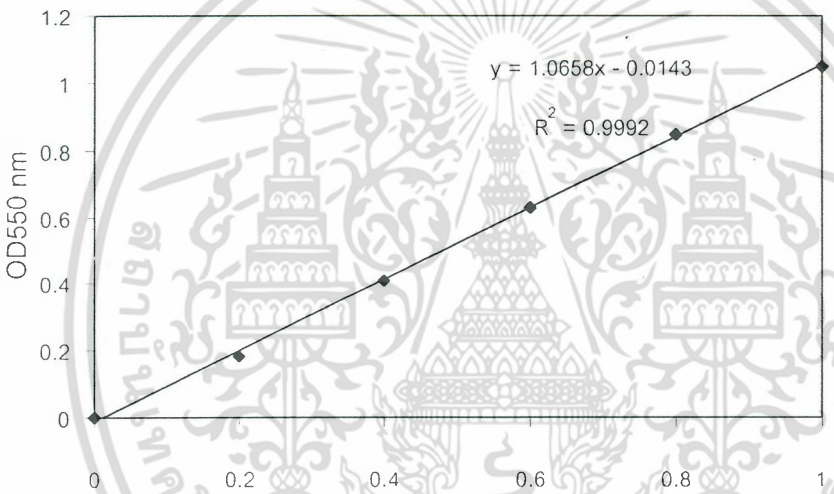
สมมุติปลดปล่อยกลูโคส X มิลลิกรัม ใน 10 นาที มีค่า = (X) x (0.555) หน่วย

จากการทดลองใช้เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร = (X) x (0.555) หน่วย

ถ้าใช้เอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร $= \frac{(X) \times (0.555)}{0.5}$ หน่วย

หรือ $= \frac{(\text{มิลลิกรัมกลูโคส}) \times (0.555)}{\text{มิลลิลิตรของเอนไซม์}}$ หน่วย/มิลลิลิตร

กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส



ภาพที่ 5 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้