สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสโดยจุลินทรีย์จากมูลโคเพื่อผลิตอาหารสัตว์

นายเชาวฤทธิ์ โสดากูล

นายวีรยุทธ เสริฐสูงเนิน

วว.
ร73801
2550

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....83970
วัน,เดือน,ปี.....23 ก.ย. 2551

b.....11975111
i.....

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Screening and Efficiency Testing for Cellulase Enzyme by Microorganism from Cow Feces for Feed Production

Chaowarit Sodagool

Weerayut Sertsungnoen

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสโดยจุลินทรีย์จากมูลโคเพื่อผลิตอาหารสัตว์
นักศึกษา	นายเชาวฤทธิ์ โสดากูล **รหัสประจำตัว** 47050121
	นายวีรยุทธ เสริฐสูงเนิน **รหัสประจำตัว** 47050164
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ. ลินจง สุขลำภู
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	นายศิริธรรม สิงห์โต
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ. ดวงใจ โอชัยกุล	
กรรมการ ผศ. ลินจง สุขลำภู	
กรรมการ นายศิริธรรม สิงห์โต	

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสโดยจุลินทรีย์จากมูลโคเพื่อผลิตอาหารสัตว์

โดย นายเชาวฤทธิ์ โสดากูล รหัส 47050121

นายวีรยุทธ เสริฐสูงเนิน รหัส 47050164

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2550

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. ลินจง สุขลำภู[1]

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม นายศิริธรรม สิงห์โต[2]

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ คัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสโดยจุลินทรีย์จากมูลโคเพื่อผลิตอาหารสัตว์ โดยนำตัวอย่างมูลโคจากแหล่งต่างๆ (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง) และนำมาคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย และแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ โดยการศึกษาบริเวณส่วนใสของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ และศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส โดยการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่า เชื้อ สายพันธุ์ III_4 V_7 และ E_{28} มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส จึงนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายเซลลูโลส พบว่า แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ มี แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมเหมือนกัน คือ กากสับปะรด อุณหภูมิที่เหมาะสม 37 °ซ. ในเชื้อสายพันธุ์ III_4 V_7 และ 45 °ซ. ในเชื้อสายพันธุ์ E_{28} และความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสม คือ พีเอช 3 และระยะเวลาที่ประสิทธิภาพของเอนไซม์ดีที่สุดคือ 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการหมักกากสับปะรดด้วยเชื้อที่คัดเลือกได้โดยแบ่งออกเป็น 7 กรรมวิธี คือ 1 (III_4) 2 (V_5) 3 (E_{28}) 4 (III_4 กับ V_5) 5 (III_4 กับ E_{28}) 6 (V_5 กับ E_{28}) และ 7 (III_4 V_5 E_{28}) พบว่ากรรมวิธีที่ 7 มีค่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดถึง 133 มก./มล. เมื่อทำการเปรียบเทียบค่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของทุกกรรมวิธี พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จึงสรุปได้ว่าการเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ร่วมกันมีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายกากสับปะรดเพื่อผลิตอาหารสัตว์

---

[1] ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง

[2] ฝ่ายเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Screening and Efficiency Testing for Cellulase Enzyme by Microorganism from Cow Feces for Feed Production
Name	Mr.Chaowarit Sodagool Mr.Weerayut Sertsungnoen
Department	Applied Biology
Program	Biotechnology
Academic Year	2007
Special Project Advisor	Assis.Prof. Linchong Suklampoo[1]
Special Project Co-Advisor	Mr. Siritham Singhtho[2]

Abstract

The objective of this research was screening and efficiency testing for cellulase enzyme by microorganism from cow feces for feed production. Bacteria and lactic acid bacteria strains from various sources of cow feces (from Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus and King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang) were selected by testing of cellulase enzyme production. Comparison of clear zone sizes and activity of cellulase enzyme by reducing sugar analysis were investigated. The results were shown that III_4 V_7 and E_{28} strains had efficiency of cellulase enzyme production. These bacteria strains were studied optimum condition of cellulose degradation, which all of them can used pineapple residue for optimum carbon source, optimum pH were 3 and optimum incubating time were 24 hours. For optimum temperature of III_4 and V_7 strains were 37 °C and E_{28} strain was 45 °C. After that, three strains were designed 7 treatments for degradation of pineapple residue, 1st (III_4), 2nd (V_5), 3rd (E_{28}), 4th (III_4 & V_5), 5th (III_4 & E_{28}), 6th (V_5 & E_{28}) and 7th (III_4 ,V_5 , E_{28}). The Seventh treatment had highest efficiency for reducing sugar production at 133 mg/ml, which had difference significantly when compared with all treatment. Therefore, three strains of 7th treatment had highest efficiency for fermentation of pineapple residue in order to feed production.

[1] Department of Applied Biology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Thailand

[2] Biotechnology Department, Thailand institute of Scientific and Technological Research, Thailand

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องด้วยความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ลินจง สุขลำภู อาจารย์ที่ปรึกษา และนายศิริธรรม สิงห์โต นักวิชาการ 6 ฝ่ายเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ชี้แนะแนวทางในการทำโครงงานพิเศษ และตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ซึ่งทางคณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดวงใจ โอชัยกุล ประธานกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

ขอขอบพระคุณนางสาวณัฏฐนันท์ บุญเสมอ ผู้ช่วยนักวิจัย ฝ่ายเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่ได้กรุณาให้ความรู้ ความช่วยเหลือ และคำแนะนำต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ตลอดมา

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ที่ให้คำปรึกษา ให้วิชาความรู้ตลอดเวลาที่ผ่านมา

ขอขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์ทุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณเพื่อนๆ ทุกคนที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษจนลุล่วงไปได้ด้วยดี

วีรยุทธ เสริฐสูงเนิน
เชาวฤทธิ์ โสดากูล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 อาหารสัตว์	3
2.2 ประเภทของอาหารสัตว์	4
2.3 การทำเศษพืชหมัก	6
2.4 การนำเศษพืชหมักมาใช้เลี้ยงสัตว์	7
2.5 ข้อดีของเศษพืชหมัก	7
2.6 การนำวัสดุพลอยได้ทางการเกษตรมาใช้ทดแทนพืชอาหารสัตว์	8
2.7 การนำสับปะรดมาใช้ทดแทนพืชอาหารสัตว์	8
2.8 เซลลูโลส	10
2.9 การย่อยสลายเซลลูโลส	11
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	13
3.1 วัตถุดิบ	13
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ	13
3.3 สารเคมี	13
3.4 อุปกรณ์	13
3.5 วัสดุ	14
3.6 วิธีทดลอง	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลอง	24
4.1 การแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ย่อยเซลลูโลสจากแหล่งต่างๆ	24
4.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส	24
4.3 ศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสของแบคทีเรียสายพันธุ์ III_4 V_7 และE_{28}	31
4.4 การศึกษาระยะเวลาและประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่ผลิตโดยเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้	40
4.5 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่เชื้อจุลินทรีย์ผลิตได้โดยการหมักกากสับปะรด	41
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	46
เอกสารอ้างอิง	48
ภาคผนวก	50
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	51
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์ทางเคมี	53
ภาคผนวก ค วิเคราะห์ผลทางสถิติ	57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ส่วนประกอบทางเคมีของเศษพืชหมัก	7
4.1 การเปรียบเทียบทางสถิติของประสิทธิภาพเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ III_4 IV_9และ V_7	28
4.2 การเปรียบเทียบทางสถิติของประสิทธิภาพเอนไซม์เซลลูเลสจากแลกติกเอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ C_5และ E_{28}	30
4.3 การเปรียบเทียบทางสถิติของประสิทธิภาพเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ III_4ในอาหาร YM ผสม กลูโคส กากสับปะรดและ CMC	32
4.4 การเปรียบเทียบทางสถิติของประสิทธิภาพเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ V_7ในอาหาร YM ผสม กลูโคส กากสับปะรดและ CMC	33
4.5 การเปรียบเทียบทางสถิติของประสิทธิภาพเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ E_{28}ในอาหาร MRS ผสม กลูโคส กากสับปะรดและ CMC	34
4.6 การเปรียบเทียบทางสถิติของประสิทธิภาพเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ III_4ที่อุณหภูมิ 30 37 และ40 องศาเซลเซียส	35
4.7 เปรียบเทียบทางสถิติของประสิทธิภาพเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ V_7ที่อุณหภูมิ 30 37 และ40 องศาเซลเซียส	36
4.8 เปรียบเทียบทางสถิติของประสิทธิภาพเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ E_{28}ที่อุณหภูมิ 30 37 และ40 องศาเซลเซียส	37
4.9 เปรียบเทียบทางสถิติของประสิทธิภาพเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ III_4ที่พีเอช 3 4 5 และ6	38
4.10 เปรียบเทียบทางสถิติของประสิทธิภาพเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ V_7ที่พีเอช 3 4 5 และ6	39
4.11 เปรียบเทียบทางสถิติของประสิทธิภาพเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ E_{28} ที่พีเอช 3 4 5 และ6	40
4.12 เปรียบเทียบทางสถิติของประสิทธิภาพเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ ต่างๆ	45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของเซลลูโลส	10
2.2 ขั้นตอนการย่อยสลายเซลลูโลส	11
3.1 แผนผังการทดลอง	23
4.1 รูปแสดงการทดสอบการย่อยเซลลูโลสในอาหารแข็ง	25
4.2 กิจกรรมการย่อยเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ III_4ที่เวลาต่างๆ	25
4.3 กิจกรรมการย่อยเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ IV_9ที่เวลาต่างๆ	26
4.4 กิจกรรมการย่อยเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ V_7ที่เวลาต่างๆ	26
4.5 เปรียบเทียบประสิทธิภาพเอนะไซม์เซลลูโลสของจุลินทรีย์สายพันธุ์ III_4 IV_9และ V_7	27
4.6 กิจกรรมการย่อยเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ C_5 ที่เวลาต่างๆ	28
4.7 กิจกรรมการย่อยเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ E_{28} ที่เวลาต่างๆ	29
4.8 เปรียบเทียบประสิทธิภาพเอนไซม์เซลลูโลสของจุลินทรีย์สายพันธุ์C_5และ E_{28}	30
4.9 ปริมาณน้ำตาลในแหล่งคาร์บอนต่างๆของแบคทีเรียสายพันธุ์ III_4	31
4.10 ปริมาณน้ำตาลในแหล่งคาร์บอนต่างๆของแบคทีเรียสายพันธุ์V_7	32
4.11 ปริมาณน้ำตาลในแหล่งคาร์บอนต่างๆของแบคทีเรียสายพันธุ์E_{28}	33
4.12 ปริมาณน้ำตาลที่อุณหภูมิต่างๆของแบคทีเรียสายพันธุ์ III_4	34
4.13 ปริมาณน้ำตาลที่อุณหภูมิต่างๆของแบคทีเรียสายพันธุ์ V_7	35
4.14 ปริมาณน้ำตาลที่อุณหภูมิต่างๆของแบคทีเรียสายพันธุ์ E_{28}	36
4.15 ปริมาณน้ำตาลที่พีเอชต่างๆของแบคทีเรียสายพันธุ์ III_4	37
4.16 ปริมาณน้ำตาลที่พีเอชต่างๆของแบคทีเรียสายพันธุ์ V_7	38
4.17 ปริมาณน้ำตาลที่พีเอชต่างๆของแบคทีเรียสายพันธุ์ E_{28}	39
4.18 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ III_4,V_5และ E_{28}	41
4.19 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ใน 24 ชั่วโมงแรกของกากสับปะรดที่หมักโดยเชื้อที่คัดเลือกได้	42
4.20 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ใน 72 ชั่วโมงแรกของกากสับปะรดที่หมักโดยเชื้อที่คัดเลือกได้	43
4.21 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในเวลา 30 วันของกากสับปะรดที่หมักโดยเชื้อที่คัดเลือกได้	44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาของโครงงานพิเศษ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ซึ่งมีรายได้จากผลผลิตทางการเกษตรเป็นจำนวนมาก หนึ่งในอุตสาหกรรมทางการเกษตรที่สำคัญก็คือ การปศุสัตว์ โดยปัจจุบันการปศุสัตว์ของไทยขยายตัวอย่างรวดเร็ว (กองแผนงาน กรมปศุสัตว์, 2549) แต่ปัญหาที่สำคัญของเกษตรกรก็คือปัจจัยด้านอาหารสัตว์ การปลูกพืชอาหารสัตว์ชนิดต่างๆเช่นพืชตระกูลหญ้า และถั่วยังมีปริมาณไม่เพียงพอต่อความต้องการของเกษตรกร ทำให้เกิดปัญหาการขาดแคลนอาหารสัตว์ในบางช่วงฤดู ส่งผลให้สัตว์มีความสมบูรณ์ลดลง ทำให้ปริมาณและคุณภาพของผลผลิตลดลง ดังนั้นจึงต้องมีการจัดหาวัสดุที่จะนำมาทดแทนพืชอาหารสัตว์ในช่วงที่มีการขาดแคลน ซึ่งประเทศไทยมีผลพลอยได้และเศษเหลือทิ้งจากการเกษตรและอุตสาหกรรมการเกษตรหลายชนิดและมีจำนวนมาก ที่สามารถนำมาใช้ทดแทนพืชอาหารสัตว์ได้ ทั้งนี้แม้ว่าเกษตรกรจะได้นำมาใช้เลี้ยงสัตว์บ้างแต่ยังเกิดประโยชน์ได้ไม่เต็มที่ อาจเนื่องจากการขาดความรู้ ความชำนาญและวิธีการนำมาใช้อาจยุ่งยาก ซึ่งได้มีนักวิชาการหลายท่านได้ทำการศึกษาวิจัยการนำผลพลอยได้และเศษเหลือจากการเกษตรและอุตสาหกรรมมาเป็นอาหารสัตว์โดยเฉพาะเป็นอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้องในช่วงฤดูแล้ง ซึ่งมีระยะเวลานาน 4-6 เดือน สำหรับผลพลอยได้และเศษเหลือจากการเกษตรที่ใช้แพร่หลายทั่วไปเช่น ฟางข้าว ยอดอ้อย ต้นข้าวโพด เปลือกและต้นถั่วเหลือง ผลพลอยได้และเศษเหลือจากสับปะรดเป็นต้น อาหารหยาบเหล่านี้ส่วนใหญ่มีคุณค่าทางโภชนาการต่ำ แต่ก็มีบ้างชนิดที่มีคุณค่าทางโภชนาการอยู่ในเกณฑ์สูง สามารถนำมาเลี้ยงสัตว์ได้ดี และบางชนิดต้องนำมาปรับปรุงคุณภาพก่อนการนำไปเลี้ยงสัตว์สำหรับกากสับปะรดเป็นวัสดุชนิดหนึ่งที่สามารถใช้เป็นอาหารแทนหญ้าหรือ เสริมหญ้าได้ (จินดา, 2547) ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ได้และมีจำนวนมากเพียงพอตลอดทั้งปี (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2548) แต่ก็ยังประสบปัญหา คือมีคุณภาพทางโภชนาการต่ำ ดังนั้นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยแก้ปัญหาดังกล่าวนี้ได้คือ การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์หลายชนิดมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่ช่วยย่อยสลายสารอินทรีย์ต่าง ๆ ในอาหารสัตว์ให้เป็นสารอาหารได้รวมถึงสังเคราะห์สารอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อสัตว์ และปัจจุบันมีการนำเอนไซม์มาใช้ผสมในอาหารสัตว์ เพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการให้กับอาหารสัตว์บางประเภท อาทิเช่น ไก่ หมู และ โค เนื่องจากการย่อยอาหารของสัตว์เหล่านี้ มักเกิดขึ้นแบบไม่สมบูรณ์ มีส่วนของอาหารที่ไม่ได้ถูกย่อยขับออกมา การใช้เอนไซม์จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการย่อยสลายขององค์ประกอบอาหารสัตว์ทำให้เกิดประโยชน์กับสัตว์มากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลลูเลส (cellulase) และ ไซแลนเนส (xylanase) เป็นเอนไซม์ประเภทย่อยสลายเส้นใย (fribrinolytic) ที่มีการใช้เสริมในอาหารสัตว์เพื่อช่วยในการย่อยสารพวกพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง (non-starch polysaccharide, NSP) ประเภทเส้นใยเซลลูโลสและ เพนโตแซน (pentosan) (หรรษา, 2546) ทำให้มีผลช่วยลดความหนืด (viscosity) ในกระเพาะของสัตว์ ดังนั้นการเสริมเอนไซม์ลงไปในอาหารสัตว์เป็นวิธีการหนึ่งที่ทำให้อาหารสัตว์ถูกย่อยได้ดีขึ้น มีการศึกษาเสริมเอนไซม์ชนิดนี้ในอาหารของลูกสุกรหย่านมและสัตว์ปีกพบว่าการย่อยอาหารของลำไส้เล็กเร็วขึ้น เนื่องจากมีปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้น การดูดซึมในส่วนลำไส้เล็กตอนต้นเพิ่มมากขึ้น มีอาหารตกค้างในลำไส้เล็กตอนปลายน้อยลง ทำให้การเจริญและการหมักของจุลินทรีย์ในลำไส้น้อยลงด้วย (จิราภรณ์, 2546)

จากคุณประโยชน์ของการใช้เอนไซม์เซลลูโลสในอาหารสัตว์จึงได้มีการจัดทำโครงงานพิเศษเรื่องการคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส โดยทำการคัดเลือกจากมูลโคเนื่องจากภายในระบบย่อยอาหารของโคมีจุลินทรีย์บ้างชนิดที่มีความสามารถในการย่อยพืชที่มีสารประกอบเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลัก ดังนั้นเมื่อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสำหรับใช้ในการผลิตอาหารสัตว์ได้ก็จะสามารถช่วยเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการให้กับอาหารสัตว์และยังช่วยลดการนำเข้าเอนไซม์สำเร็จรูปจากต่างประเทศได้อีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากมูลโคที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส
2. ทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ ที่คัดเลือกได้
3. ทำการทดสอบเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่ เวลา อุณหภูมิ และพีเอช

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

คัดเลือกจุลินทรีย์จากมูลโคที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส จากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่สร้างจากจุลินทรีย์ดังกล่าว และทดสอบเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ เวลา อุณหภูมิ และ พีเอช

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส
2. ทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์ดังกล่าว
3. สามารถนำข้อมูลและจุลินทรีย์ที่ได้มาพัฒนาเพื่อใช้ในการผลิตอาหารสัตว์ต่อไปได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

ประเทศไทยมีการทำการปศุสัตว์กันอย่างแพร่หลาย โดยการทำการปศุสัตว์ในประเทศไทยสามารถจำแนกได้หลายชนิด เช่น การเลี้ยงไก่เนื้อ การเลี้ยงไก่ไข่ การเลี้ยงโคเนื้อ การเลี้ยงโคนม และการเลี้ยงสุกร เป็นต้น การเลี้ยงสัตว์ในประเทศไทย ณ ปัจจุบันได้ประสบปัญหาในหลายหลายด้าน เช่น ปัญหาด้านต้นทุนการผลิต และปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นจึงมีการผลิตที่มุ่งพัฒนาและปรับปรุงในด้านของสายพันธุ์ สัตว์รวมจนถึงด้านโภชนาการของสัตว์ ดังนั้นปัจจัยด้านอาหารนับว่ามีความสำคัญต่อระบบการผลิตปศุสัตว์ในการเพิ่มประสิทธิภาพ และการลดต้นทุนการผลิต แหล่งวัตถุดิบอาหารสัตว์ในประเทศไทยหลายชนิดมีคุณค่าทางโภชนาการที่สำคัญต่อการผลิตปศุสัตว์ นอกจากนั้นแล้วการคัดเลือกใช้วัตถุดิบที่มีอยู่ในฤดูกาลต่างๆ ให้เหมาะสมทั้งด้านปริมาณและคุณภาพซึ่งจะนำไปสู่การผลิต ผลิตภัณฑ์ต่างๆจากสัตว์ได้อย่างมีคุณภาพ

2.1 อาหารสัตว์

อาหารสัตว์ หมายถึง วัตถุที่มุ่งหมายเพื่อใช้เลี้ยงสัตว์ ซึ่งอาหารสัตว์ได้มาจากแหล่งอาหารสัตว์หลายแหล่ง ดังนี้

1) แหล่งอาหารสัตว์ธรรมชาติ ได้แก่ หญ้า ถั่ว และพืชอื่นๆ ที่ขึ้นตามธรรมชาติ เป็นอาหารของโค กระบือ แพะ แกะ ช้าง ม้า เช่น หญ้าเพ็จในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ หญ้าธรรมชาติที่ขึ้นปกคลุมตามทุ่งนาและคันนา ป่าละเมาะและที่รกร้าง ซึ่งมีหญ้าและพืชอาหารสัตว์ขึ้นปะปนอยู่ เป็นแหล่งอาหารธรรมชาติที่เกษตรกรได้ใช้เลี้ยงโค กระบือโดยทั่วๆ ไป

2) แหล่งอาหารสัตว์ที่มนุษย์ผลิตขึ้น ได้แก่ เมล็ดพืชต่างๆ ที่เก็บเกี่ยวจากไร่นา เช่น เมล็ดข้าวโพด ข้าวฟ่าง ตลอดจนหัวมันสำปะหลัง ซึ่งปลูกเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์โดยเฉพาะ

3) แหล่งอาหารสัตว์ที่เป็นเศษวัสดุเหลือใช้จากโรงงานต่างๆ เช่นกากถั่วเหลือง กากถั่วลิสง รำข้าว และปลายข้าว กากน้ำมันมะพร้าว กากปาล์ม และกากยางพารา ส่าเหล้า กากเบียร์ กากน้ำตาล เศษสับปะรด มะเขือเทศ และหน่อไม้ฝรั่ง กระดูกป่น วัสดุเหลือใช้เหล่านี้มีคุณค่าทางโภชนาการสูง

4. แหล่งอาหารสัตว์ที่เป็นวัสดุพลอยได้จากไร่นา ส่วนใหญ่จะเป็นใบพืชเช่น ยอดอ้อย เศษต้นและเปลือกข้าวโพดฝักอ่อน ฟางข้าว ใบมันสำปะหลัง ใบปอกระเจา ซึ่งจัดอยู่ในประเภทอาหารหยาบ ใช้เลี้ยงโค กระบือ แพะ แกะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5) แหล่งอาหารสัตว์ที่เป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ได้แก่ ปลาป่น เปลือกหอย กระดูกสัตว์ เป็นแหล่งอาหารสัตว์ที่สำคัญเช่นกัน ทำเป็นอาหารป่นใช้ผสมกับอาหารชนิดอื่นๆ ปลาป่นให้สารอาหารโปรตีนส่วนเปลือกหอยและกระดูกป่นให้อาหารแร่ธาตุ เช่น แคลเซียมและฟอสฟอรัส

6) แหล่งอาหารสัตว์ที่เป็นทุ่งหญ้า เป็นแหล่งอาหารสำคัญสำหรับสัตว์ประเภทกินหญ้า เช่น โค กระบือ แพะ แกะ ช้าง ม้า มีการเพาะปลูกบำรุงรักษาเช่นเดียวกับการปลูกข้าวและข้าวโพด โดยใช้พันธุ์หญ้าและถั่วพันธุ์ดีโดยเฉพาะ บำรุงรักษาโดยการใส่ปุ๋ย กำจัดวัชพืช ปล่อยโคแทะเล็มเองหรือตัดให้กิน พันธุ์หญ้าที่ใช้กันมาก ได้แก่ หญ้ารูซี กินนี เนเปียร์ และพืชอื่นๆ ได้แก่ ถั่วลาย ถั่วฮามาตา และกระถิน เป็นต้น

2.2 ประเภทของอาหารสัตว์

การจำแนกประเภทอาหารสัตว์แบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ

อาหารหยาบ เป็นอาหารสำคัญของสัตว์ ประเภทกินหญ้าเป็นหลัก เช่น โค กระบือ แพะ แกะ มีสารอาหาร เช่น โปรตีน และพลังงานน้อย แต่มีสารย่อยยากหรือกากมาก เช่น ต้นหญ้าต่างๆ ต้นข้าวโพด ฟางข้าว ยอดอ้อย เถาถั่ว และใบพืชอื่นๆ ที่สัตว์กินได้ เช่น กระถิน ทองหลาง แค และใบมันสำปะหลัง เป็นต้น

ลักษณะของอาหารหยาบสำหรับโคเนื้อและโคนมนั้นสามารถใช้เหมือนกันได้ทุกชนิดซึ่งการปลูกพืชอาหารสัตว์เพื่อใช้เป็นอาหารหยาบในการเลี้ยงโคเนื้อและโคนม ใช้วิธีการปลูกเพียงหญ้าหรือพืชตระกูลถั่วชนิดใดชนิดหนึ่งก็ได้ แต่ถ้าต้องการให้แปลงปลูกพืชอาหารนั้นสามารถเลี้ยงโคได้อย่างมีประสิทธิภาพ ควรปลูกแบบผสมกันทั้งหญ้าและพืชตระกูลถั่วตามชนิดพันธุ์ที่ได้กล่าวเอาไว้ในเรื่องของวัตถุดิบอาหาร สำหรับวิธีการให้อาหารควรให้ทั้งวิธีปล่อยเลี้ยงในแปลงให้โคเข้าไปแทะเล็มเอง และเก็บเกี่ยวมาไว้ในคอกให้ด้วยเพราะการปล่อยให้โคได้เข้าไปแทะเล็มหญ้าเองในแปลงจะทำให้โคมีสุขภาพจิตที่ดี ส่งผลให้โคกินอาหารได้มากและเจริญเติบโตได้เป็นปกติ

โดยทั่วไปแล้วอาหารหยาบจำพวกพืชอาหารสัตว์เหล่านี้ สามารถใช้เลี้ยงสัตว์ได้ดีในช่วงฤดูฝน เนื่องจากพืชอาหารสัตว์จะงอกงามเจริญเติบโตและอุดมสมบูรณ์ที่สุด ฉะนั้นในช่วงฤดูแล้งเกษตรกรผู้เลี้ยงอาจต้องทำการสำรองอาหารสัตว์เอาไว้ใช้ เพื่อลดต้นทุนการใช้ค่าอาหารข้น เช่น การทำหญ้าหรือฟางอัดฟ่อน การทำฟางปรุงแต่ง การทำหญ้าหมัก การเก็บรักษาและขั้นตอนการทำหญ้าและฟางเอาไว้สำรองในช่วงหน้าแล้ง หรือนำวัสดุพลอยได้ต่างๆ ทางการเกษตรมาใช้แทน เช่น ต้นข้าวโพด ซึ่งได้จากการผลิตข้าวโพดฝักอ่อน สามารถนำมาเลี้ยงโคนมได้เป็นอย่างดี (จินดาและอุเทน, 2534) นอกจากนี้ยังมีวัสดุผลพลอยได้ทางการเกษตรที่สำคัญ คือผลพลอยได้จากการปลูกสับปะรด จังหวัดประจวบคีรีขันธ์และเพชรบุรี มีพื้นที่ปลูกสับปะรดมากกว่า 6 แสนไร่ จากพื้นที่ 1 ไร่ (สมบัติและคณะ, 2539) เปลือกสับปะรด 2.7 ตัน ใบ 4.0 ตัน และจุกสับปะรด 0.357 ตัน (สมบัติและคณะ, 2539) เปลือกสับปะรดได้จากโรงงานผลิตสับปะรดกระป๋อง และจุกสับปะรดจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไร่ที่เกษตรกรตัดทิ้ง นำมาเลี้ยงโคนมได้โดยเสริมด้วยหญ้าสด และอาหารข้น (จินดาและปรัชญา, 2542)

อาหารข้น เป็นกลุ่มอาหารสัตว์ที่มีสารอาหารหลายชนิดที่มีโภชนาการสูง ย่อยง่าย มีกากหรือเยื่อใยน้อย ตัวอย่างเช่น เมล็ดธัญพืชต่างๆ เมล็ดข้าวโพด ถั่วเหลือง ถั่วลิสง หัวมัน กากถั่วต่างๆ กากเมล็ดปาล์มน้ำมัน รำข้าว และปลาป่นอาหารข้นใช้เลี้ยงสัตว์ทุกชนิดได้

อาหารข้นยังถูกแบ่งย่อยออกเป็นกลุ่มอาหารเสริมต่างๆ เช่น อาหารเสริมโปรตีน ซึ่งเป็นอาหารที่มีโปรตีนปนอยู่มาก ใช้เติมในอาหารสัตว์ให้มีปริมาณโปรตีนเพียงพอ อาจได้จากกากถั่วต่างๆ หรือปลาป่น เศษเนื้อป่น อาหารเสริมแร่ธาตุ ซึ่งเป็นกลุ่มอาหารสัตว์ที่มีแร่ธาตุต่างๆเป็นส่วนประกอบอย่างเข้มข้น เช่นกระดูกป่น เกลือจุนสี และธาตุเหล็ก เป็นต้น อาหารเสริมที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งคือ อาหารเสริมวิตามิน เช่น น้ำมันตับปลา และวิตามินสังเคราะห์ นอกจากนั้นมีสารตัวเร่งการเจริญบางอย่าง เช่น ยาปฏิชีวนะ ใช้เติมในอาหารสัตว์เพียงเล็กน้อย ช่วยให้สัตว์เจริญเติบโตได้ดี สารตัวเร่งนี้ต้องใช้อย่างระมัดระวังมีกฎหมายควบคุมการใช้ เพราะถ้าใช้มากเกินไป อาจเป็นอันตรายกับผู้บริโภคเนื้อสัตว์ เช่น ในกรณีการเลี้ยงสุกร อาหารเสริมที่สำคัญ ได้แก่ อาหารเสริมกรดอะมิโนไลซีน กรดอะมิโนไลซีนมีในอาหารสัตว์ไม่เพียงพอ จึงมีการสังเคราะห์และใช้เสริมเพิ่มเติมในอาหาร ลดค่าใช้จ่ายของอาหารโปรตีนลงได้ กรดอะมิโนเป็นส่วนประกอบของโปรตีนมีหลายชนิด แต่ที่จำเป็นและขาดไม่ได้มี 10 ชนิด คือ เมไทโอนีน (methionine) อาร์จินีน (arginine) ทริปโทเฟน (tryptophane) ไทรโอนีน (trionine) ฮิสทิดีน (histidine) ไอโซลูซีน (isoleucine) ลูซีน (leucine) ไลซีน (lysine) วาลีน (valine) และเฟนิลอะลานีน (phenylalanine)

ในปัจจุบันเกษตรกรเริ่มมีการเลี้ยงโคนมเป็นอาชีพหลักและอาชีพเสริมที่มีรายได้ดีและสม่ำเสมอเมื่อเทียบกับการประกอบอาชีพเกษตรกรรมประเภทอื่นแต่การเกษตรมักประสบปัญหานานาชนิด เช่น ผลผลิตตกต่ำ ราคาผลผลิตไม่แน่นอน ต้นทุนการผลิตสูงเป็นต้น ซึ่งเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมมักประสบปัญหาเหล่านี้ โดยเฉพาะต้นทุนการผลิตที่เพิ่มขึ้นมากกว่ารายได้ ต้นทุนการผลิตส่วนใหญ่จะเป็นค่าอาหารสัตว์ที่สูงถึงร้อยละ 60 – 70 ของค่าใช้จ่ายทั้งหมด ดังนั้นสิ่งที่สำคัญที่สุดของผู้เลี้ยงสัตว์คือการลดต้นทุนการผลิตหรือต้นทุนค่าอาหารสัตว์ เพื่อให้สามารถคงธุรกิจการเลี้ยงสัตว์อยู่ได้ การลดต้นทุนการผลิตที่สามารถทำได้คือการใช้อาหารอย่างมีประสิทธิภาพ โคนมเป็นสัตว์ที่ต้องใช้ทั้งอาหารข้นและอาหารหยาบ อาหารหยาบได้แก่อาหารสัตว์ เช่น หญ้าและถั่ว แต่อาหารหยาบในบ้านเรามักจะมีคุณภาพต่ำและปริมาณไม่เพียงพอกับความต้องการของสัตว์ เนื่องจากเกษตรกรมีพื้นที่จำกัดในการทำแปลงพืชอาหารสัตว์ และมักขาดแคลน อาหารสัตว์ในช่วงฤดูแล้ง ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องหาวิธีการเก็บรักษาพืชอาหารสัตว์ หรือหาวัสดุทดแทนเพื่อแก้ปัญหาการขาดแคลนพืชอาหารสัตว์ในฤดูแล้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การทำเศษพืชหมัก

การทำเศษพืชหมักเป็นวิธีการสำรองหญ้าเอาไว้ใช้เลี้ยงสัตว์ให้ได้ระยะเวลานานขึ้น ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่ไม่ทำให้คุณค่าทางโภชนาการจากหญ้านั้นลดลง ลักษณะของหญ้าหมักคือ การนำหญ้าที่เกี่ยวในระยะที่เหมาะสม (เช่นเดียวกันกับการเกี่ยวหญ้าในการทำหญ้าอัดฟ่อน) มาเก็บรักษาคุณภาพไว้ในสภาพไร้ก๊าซออกซิเจนเพื่อไม่ให้เกิดการบูดเน่า หญ้าหรือพืชอาหารที่นิยมและเหมาะสมที่จะนำมาทำเป็นหญ้าหมัก เช่น หญ้าพันธุ์ต่างๆ พืชตระกูลถั่ว เปลือกและต้นข้าวโพด ซึ่งหญ้าหมักสามารถทำได้ 2 รูปแบบ คือ หญ้าหมักสด และ หญ้าหมักแห้ง ดังนี้

1) หญ้าหมักสด คือ หญ้าหมักที่ได้จากต้น และใบของพืชสด ที่มีความชื้นสูงนำมาหมัก

2) หญ้าหมักแห้ง คือ หญ้าหมักที่นำเอาพืชซึ่งได้ระเหยความชื้นออกบ้างแล้วบางส่วน มาทำการหมักและต้องดูดเอาอากาศออกจากหลุมที่กำลังทำหญ้าหมักด้วย

วิธีการทำพืชหมัก

1) นำหญ้าหรือพืชอาหารชนิดต่างๆ ที่ต้องการจะทำการหมัก มาหั่นเป็นชิ้นๆ ให้มีความยาวประมาณ ½ - 1 นิ้ว ในกรณีที่มีเครื่องตัดหญ้าแบบพ่วงรถแทรคเตอร์สามารถนำหญ้าที่ตัดแล้วมาใช้ได้เลย

2) นำหญ้าใส่ลงในถังหรือหลุมหมักแล้วทำการอัดหญ้าให้แน่นที่สุดด้วยวิธีใดก็ได้หรืออัดให้แน่นจนเหลือช่องว่างอากาศน้อยที่สุด ถ้าหญ้านั้นแห้งจนเกินไปอาจจะรดน้ำให้ชุ่มพอประมาณ

3) เมื่อบรรจุหญ้าได้ตามปริมาณที่ต้องการแล้ว ให้ใช้แผ่นพลาสติกใสหรือเต็นท์คลุมให้มิดชิด ถ้าทำหญ้าหมักในหลุมก็ให้กลบด้วยดินอีกรอบ โดยกลบดินให้เป็นรูปหลังเต่ามีความหนาประมาณ 6 – 12 นิ้ว เพื่อป้องกันไม่ให้น้ำท่วมขังได้

ลักษณะของเศษพืชหมักที่มีคุณภาพดี

1) จะต้องมีกลิ่นหอมไม่เหม็นเน่าเพราะช่วยให้สัตว์อยากกินหญ้าหมักมากขึ้น

2) จะต้องมีรสชาติดี ไม่มีรสขม เพราะช่วยให้สัตว์กินหญ้าหมักได้มากขึ้น

3) ปราศจากเชื้อรา และเศษหญ้าที่เน่าเปื่อย เพราะอาจเป็นอันตรายต่อสัตว์ได้

4) มีความชื้นและสีที่พอเหมาะสม่ำเสมอกันดีทั่วทั้งถังหรือหลุมหมักหญ้า

การทำเศษพืชหมักให้มีคุณภาพ

หญ้าหรือพืชอาหารที่จะนำมาทำการหมัก ต้องเกี่ยวในช่วงระยะเวลาที่เหมาะสม ความยาวที่เหมาะสมในการหั่นหญ้า ซึ่งความยาวของท่อนหญ้าหรือพืชที่นำมาหมักนี้จะขึ้นกับโอกาสที่จะมีช่องว่างระหว่างชิ้น เมื่อทำการบรรจุลงถังหรือหลุมจะต้องให้มีอากาศแทรกได้น้อยที่สุด ความชื้นของพืชที่ใช้ทำหญ้าหมักพบว่าความชื้นที่เหมาะสมที่สุดสำหรับพืชที่จะใช้ทำหญ้าหมัก คือ ประมาณ 62 – 67 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีที่มีความชื้นของพืชที่นำมาหมักสูงหรือต่ำจนเกินระดับดังกล่าวสามารถจะแก้ไขได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การนำเศษพืชหมักมาใช้เลี้ยงสัตว์

หญ้าหมักนอกจากจะสามารถนำไปใช้เป็นอาหารหยาบเลี้ยงสัตว์จำพวกเคี้ยวเอื้องได้แล้ว ยังสามารถนำไปใช้เลี้ยงสัตว์ชนิดอื่นๆ ได้อีก ดังนี้

1)โคเนื้อ สามารถนำไปใช้เลี้ยงได้ประมาณ 10 – 13 กิโลกรัม/ตัว/วัน

2)โคนม สามารถนำไปใช้เลี้ยงได้ประมาณ 12 – 15 กิโลกรัม/ตัว/วัน

3) แพะ หรือ แกะ สามารถนำไปใช้เลี้ยงได้ประมาณ 4-6 กิโลกรัม/ตัว/วัน

4) สุกร สามารถนำไปใช้เลี้ยงได้ประมาณ 1.5 – 3 กิโลกรัม/วัน

5) ไก่ สามารถนำไปใช้เลี้ยงได้ประมาณ 2 – 4 กิโลกรัม/100 ตัว /วัน

หมายเหตุ : ปริมาณเศษพืชเลี้ยงโคเนื้อ และโคนมข้างบนดังกล่าว เป็นปริมาณที่ให้หลังจากที่โคได้กินหญ้าแห้งตามปกติแล้ว

ตารางที่ 2.1 ส่วนประกอบทางเคมีของเศษพืชหมัก

ชนิดของพืช	วัตถุแห้ง (ร้อยละ)	โปรตีน (ร้อยละ)	ไขมัน (ร้อยละ)	เส้นใย (ร้อยละ)
ข้าวโพด	20.3	1.8	0.6	5.8
หญ้าเนเปียร์อ่อน	19.9	1.1	0.5	7.3
ยอดอ้อย	29.6	1.5	0.6	10.6
หญ้าขน	18.7	2.1	1.34	20.85
เศษสับปะรด	11.95	0.44	1.43	6.3

ที่มา : จินดา(2528)

2.5 ข้อดีของเศษพืชหมัก

1) ทำให้เศษพืชสดเสียคุณค่าทางโภชนาการอาหารน้อยกว่าเศษพืชแห้ง

2) สามารถผลิตเก็บเอาไว้ใช้ได้ทุกฤดูกาล ทุกสภาพอากาศ โดยเฉพาะในช่วงฤดูฝนที่มีหญ้าอุดมสมบูรณ์ก็สามารถจะทำหญ้าหมักเก็บเอาไว้ใช้ได้ ในขณะที่หญ้าแห้งไม่สามารถทำได้

3) สามารถใช้ทุกส่วนของต้นพืชมาหมักทำเป็นอาหารหยาบให้สัตว์ได้ กล่าวคือ ลำต้นที่จะแข็งกว่าใบ แต่เมื่อนำมาทำการหมักแล้ว จะมีลักษณะที่นุ่มขึ้นจนสัตว์สามารถจะเคี้ยวกินได้ง่ายเหมือนเคี้ยวใบ

4) หญ้าหมักใช้เนื้อที่ในการเก็บรักษาที่น้อยกว่าหญ้าแห้ง

5) สามารถควบคุมแมลงและศัตรูพืชบางชนิดได้ เพราะการทำหญ้าจะใช้ทุกส่วนของลำต้นมาทำ จึงเป็นการทำลายที่อยู่อาศัยของศัตรูพืชไปในตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6) แม้พืชที่นำมาหมักจะมีเมล็ดอยู่ก็สามารถจะทำการหมักได้โดยไม่ก่อให้เกิดผลเสีย

7) มีคุณสมบัติเป็นยาระบายอย่างอ่อนให้กับสัตว์ได้เป็นอย่างดี สร้างเสริมให้สัตว์มีสุขภาพแข็งแรง

8) สามารถเก็บเอาไว้ใช้ได้ตลอดทั้งปี และไม่ต้องคอยระมัดระวังอันตรายอันเนื่องมาจากไฟไหม้หญ้า

2.6 การนำวัสดุพลอยได้ทางการเกษตรมาใช้ทดแทนพืชอาหารสัตว์

การนำวัสดุพลอยได้ทางการเกษตรมาใช้ทดแทนพืชอาหารสัตว์เป็นอีกวิธีหนึ่ง ที่ใช้แก้ปัญหาการขาดแคลน พืชอาหารสัตว์ใน ฤดูแล้ง ซึ่งวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร และจากโรงงานอุตสาหกรรม ที่นำมาใช้ ได้แก่ ฟางข้าว ต้นข้าวโพด เปลือกสับปะรด เป็นต้น ซึ่งส่วนใหญ่มีคุณค่าทางโภชนาการต่ำ นำมาใช้เลี้ยงโคนมตามสภาพวัตถุดิบที่มีในแต่ละพื้นที่ การนำวัตถุดิบซึ่งมีคุณค่าทางโภชนาการค่อนข้างต่ำมาใช้เลี้ยงโคนม จำเป็นต้องมีการปรับปรุงคุณภาพให้มีความเหมาะสมที่จะนำมาเลี้ยงสัตว์

2.7 การนำสับปะรดมาใช้ทดแทนพืชอาหารสัตว์

เปลือกและเศษสับปะรด เป็นวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตสับปะรดกระป๋อง โดยมีส่วนประกอบที่เป็นผลิตผลพลอยได้จากการผลิตสับปะรดกระป๋อง ได้แก่ เปลือกแกนกลาง เศษเนื้อและจุก (ตะเกียง) รวมทั้งผลสับปะรดที่คัดทิ้งเนื่องจากไม่ได้มาตรฐานจากผู้ขายรายย่อยที่นำสับปะรดให้แก่โรงงาน มีปริมาณหลายร้อยตัน/วัน แต่ในปัจจุบันกลุ่มผู้เลี้ยงโคนม และโคเนื้อในแถบพื้นที่ใกล้เคียงโรงงานอุตสาหกรรมสับปะรดกระป๋องนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ในอุตสาหกรรม การเลี้ยงโคนม โคเนื้อกันอย่างแพร่หลาย มักประสบปัญหาอาหารสัตว์ที่เกษตรกรผลิตไม่ได้มาตรฐาน ไม่มีคุณภาพเนื่องจากมีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นพิษ ก่อให้เกิดปัญหาด้านสุขภาพของสัตว์ ส่งผลโดยตรงกับคุณภาพของน้ำนมซึ่งมีสารปฏิชีวนะเกินมาตรฐาน ทำให้กลุ่มเกษตรกรประสบปัญหาน้ำนมมีสารเจือปน จากปัญหาที่เกิดขึ้นดังกล่าว จำเป็นต้องใช้เทคโนโลยีการผลิตอาหารสัตว์ให้ถูกสุขลักษณะได้มาตรฐานทั้งในด้านของการจัดเตรียมวัตถุดิบ (เศษสับปะรด) ขั้นตอนในการหมัก ระยะเวลาในการหมัก และที่สำคัญคือการพัฒนาการใช้จุลินทรีย์ในการปรับปรุงคุณภาพอาหารสัตว์ จากเศษสับปะรดทำให้ได้อาหารสัตว์ที่มีคุณภาพเสริมสร้างความแข็งแรง การเจริญเติบโตของสัตว์และให้ผลผลิตที่สูงขึ้น ที่สำคัญคือสามารถลดต้นทุนการผลิตของเกษตรกรได้

ในต่างประเทศ เช่น มาเลเซีย ฟิลิปินส์ และสหรัฐอเมริกา ฯลฯ ได้นำเปลือกสับปะรดไปใช้เป็นอาหารสัตว์แล้ว ได้ผลดี โดยเฉพาะในสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น โคเนื้อ โคนม และแกะ โดยสามารถใช้ได้หลายรูปแบบ คือ ในสภาพสด หมักและแห้ง Udin (1978) รายงานว่าในประเทศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มาเลเซีย ได้นำวัสดุเหลือใช้จากโรงงานทำสับปะรดกระป๋องมาใช้เลี้ยงโคขุนเพื่อการค้า โดยใช้กากสับปะรดร้อยละ 78 ร่วมกับมูลไก่ร้อยละ 10 กากปาล์มร้อยละ 3 กากน้ำตาลร้อยละ 5 กากถั่วร้อยละ 2 และสารเคมีที่ใช้เป็นอาหารสัตว์อีกร้อยละ 1 อาหารมีโปรตีนร้อยละ 14 และมีโภชนะย่อยได้ร้อยละ 70 มีการเสริมเกลือแร่และวิตามินครบตามความต้องการของสัตว์ ร้อยละที่ได้จากการขุนโคโดยวิธีนี้เท่ากับร้อยละ 54-56 และในประเทศฟิลิปปินส์ได้มีเอกชนเลี้ยงโคขุนเพื่อการค้าโดยใช้เปลือกสับปะรดเป็นอาหารเกินกว่าร้อยละ 50 Perezและ Hsu (1973) รายงานว่าไต้หวันได้ใช้เปลือกสับปะรด ร้อยละ 70 ข้าวโพดร้อยละ 10.8 กากถั่วเหลืองร้อยละ 18 และยูเรียร้อยละ 1.2 ขุนโคนมพันธุ์ผสมขาว-ดำ พบว่าสามารถเพิ่มน้ำหนักตัวได้ดี Mc.Dowell (1972) รายงานว่ามีผู้เลี้ยงโคนมในประเทศเปอร์โตริโกหลายรายใช้เปลือกสับปะรดเลี้ยงโคนมเป็นระยะเวลาถึง 8 เดือนในแต่ละปี โดยให้กินเปลือกสับปะรดอย่างเต็มที่ ร่วมกับอาหารเสริมมีโปรตีนร้อยละ 24 โคนมดังกล่าวสามารถให้นมในระดับน่าพอใจ

สำหรับในประเทศไทยได้มีนักวิชาการหลายท่านได้รายงานผลงานวิจัยการใช้สับปะรดเป็นอาหารเลี้ยงโคในลักษณะต่างๆกัน รวมทั้งผลพลอยได้ เช่น ใบ จุก และต้นทำให้ ได้ข้อมูลทางวิชาการ ซึ่งได้รวบรวมมาไว้เพื่อใช้ในการศึกษาและพัฒนาเพื่อให้ได้ข้อมูลไปใช้ส่งเสริมและแนะนำเกษตรกรและผู้สนใจต่อไป

ในพื้นที่เขตภาคกลางตอนล่าง ซึ่งมีการเลี้ยงโคนมค่อนข้างหนาแน่น โดยเฉพาะเขตจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ เกษตรกรส่วนใหญ่จะอาศัยเปลือกสับปะรดจากโรงงานสับปะรดกระป๋องเลี้ยงโคนมเกือบตลอดทั้งปี จะมีปัญหาการขาดแคลนเปลือกสับปะรดช่วงเดือนกรกฎาคม ถึง เดือนตุลาคม ของทุกปี เนื่องจากผลผลิตมีน้อย และโรงงานหยุดผลิตสับปะรดกระป๋อง สมบัติและคณะ (2539) รายงานว่าการปลูกสับปะรดในพื้นที่ 1 ไร่ จะได้ผลพลอยได้ ซึ่งประกอบด้วยเปลือก เศษเนื้อและแกนกลางประมาณ 2.70 ตัน ใบ 4.0 ตัน และจุก 0.357 ตัน จากการวิเคราะห์พบว่าเปลือกสับปะรดมีโปรตีนร้อยละ 6.44 ไขมันร้อยละ 3.81 เส้นใยร้อยละ 13.96 และ NFE ร้อยละ 52.95 โดยน้ำหนักแห้ง (จินดา และคณะ, 2528) จากผลการวิเคราะห์เปลือกสับปะรดแห้งจัดเป็นอาหารหยาบคุณภาพปานกลาง (กองอาหารสัตว์, 2538) สามารถนำมาใช้เลี้ยงโคนมได้ โดยใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารผสมเสร็จ หรือ Total Mixed Ration (TMR) ซึ่งเป็นอาหารผสมครบส่วน ที่รวมทั้งอาหารหยาบ อาหารข้น อาหารแร่ธาตุ และ วิตามินเข้าด้วยกันในสัดส่วนที่เหมาะสม ซึ่งมีโภชนาการต่าง ๆ ครบตามความต้องการของโคนม การใช้อาหาร TMR เกษตรกรจะสะดวกในการใช้ และง่ายต่อการจัดการ ทำให้เกษตรกรสามารถเลี้ยง โคนมได้มากขึ้น ประหยัดแรงงานในการเลี้ยงดู และนอกจากนี้การใช้อาหาร TMR มีประโยชน์ต่อตัวโค คือสามารถรักษาระดับความเป็นกรด – เบส ในกระเพาะรูเมน ให้มีสภาพเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ทำให้การทำงานของจุลินทรีย์ เช่น การหมักย่อย การดูดซึมอาหาร ไปใช้ประโยชน์เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ

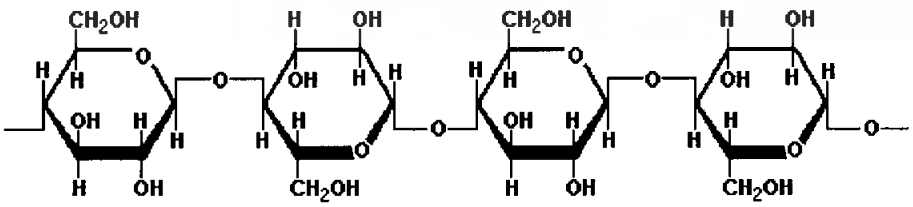
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจุบันมีโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตสับปะรดกระป๋องในพื้นที่ จ.ประจวบคีรีขันธ์ จ. เพชรบุรี จ. ชลบุรี และ จ. ระยอง หลายโรงงานมีวัตถุดิบเหลือทิ้งมาก การนำกากสับปะรดมาใช้เป็นอาหารหยาบประเภทหมักอย่างถูกต้อง สามารถทำให้ลดต้นทุนการผลิต และเสริมสร้างการเจริญเติบโตของสัตว์ ทำให้อุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์ โคนม โคเนื้อในปัจจุบันได้ มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง ในปัจจุบันเกษตรรายย่อยและรายใหญ่มีการผลิตสับปะรดหมักเพื่อใช้เลี้ยงสัตว์ แต่การผลิตไม่ถูกต้องตามหลักโภชนศาสตร์ ทำให้เกิดปัญหาข้างเคียงมากมาย เช่นมีจุลินทรีย์ที่เป็นพิษก่อให้เกิดปัญหาทำให้สัตว์มีสุขภาพไม่แข็งแรง และมีการใช้ยาปฏิชีวนะกันมากทำให้เกิดสารตกค้างและเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค รวมทั้งคุณภาพของผลิตภัณฑ์ตกต่ำ ไม่เป็นที่ยอมรับโดยเฉพาะอย่างยิ่งการเลี้ยงโคนม และโคเนื้อ ที่เห็นได้ชัด ดังนั้นจึงต้องมีการปรับปรุงคุณภาพของกากสับปะรดที่นำมาใช้เพื่อให้เหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์

การหมักโดยจุลินทรีย์เป็นวิธีหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงคุณภาพของ กากสับปะรด เนื่องจาก กากสับปะรดมีส่วนประกอบหลักคือ เซลลูโลส ซึ่งเมื่อทำการหมักโดยจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้าง เอนไซม์เซลลูเลส จะทำให้เซลลูโลสที่มีอยู่ถูกย่อยเป็นกลูโคสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่สามารถนำไปใช้ได้ง่าย

2.8 เซลลูโลส

เซลลูโลส (Cellulose) เป็นสารประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์พืช เป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีมากที่สุดในโลก เป็น glucan ที่มี glucose มาเชื่อมต่อกันด้วย พันธะ β (1 - 4) เป็นสายยาวและตรง ไม่แตกกิ่ง ถูกทำให้แข็งโดย H- bonds ระหว่างอะตอมของออกซิเจนบนวงแหวน Pyranose กับหมู่ –OH ของโมเลกุลถัดไป และรวมตัวกันเป็นมัด เรียกว่า เส้นใย (fibril) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ไม่สามารถใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งของพลังงาน เนื่องจากไม่มีเอนไซม์ cellulase แต่เส้นใยที่ย่อยไม่ได้นี้ รวมทั้งเส้นใยจำพวกอื่นของพืช เช่น hemicellulose และ pectin มีประโยชน์ในสถานะเป็นกากอาหาร (fiber)



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของเซลลูโลส

ที่มา : หรรษา (2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9 การย่อยสลายเซลลูโลส

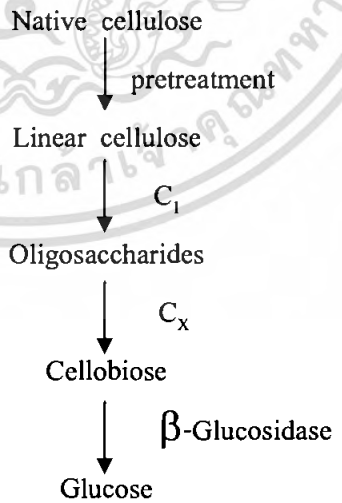
เซลลูโลสเป็นสารประกอบพวกโพลีแซคคาไรด์ชนิดหนึ่งที่มีมากในผนังเซลล์ของพืช โครงสร้างของโมเลกุลเป็นแบบไม่มีกิ่งก้านสาขา ประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสหลายๆ หน่วยมาต่อกันเป็นเส้นยาวด้วย พันธะ β (1-4) เซลลูโลสจะไม่ละลายด้วยน้ำ ตัวทำละลายอินทรีย์ หรือสารละลายเบสอ่อน แต่จะละลายในกรดและเบสแก่ เมื่อย่อยสลายโดยสมบูรณ์ด้วยกรดหรือเอนไซม์จะได้น้ำตาลกลูโคสอย่างเดียว แต่ถ้าการย่อยสลายดัวไม่สมบูรณ์จะได้เซลโลไบโอส (Cellobiose) ซึ่งเป็นไดแซคคาไรด์ (Disaccharide) และได้โอลิโกแซคคาไรด์ (Oligosaccharide) อื่นๆ

เอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสจะเรียกว่าเซลลูเลส พบว่าเอ็นไซม์เซลลูเลสเป็นเอ็นไซม์เชิงซ้อน (Complex enzyme) ที่ประกอบด้วยเอ็นไซม์อย่างน้อย 3 ชนิด ทำงานร่วมกันคือ C_x [Endoglucanases; 1,4–β–D–glucan 4–glucanohydrolase; EC 3.2.1.4], C_1 [Exoglucanases; 1,4–β–D–glucan cellobiohydrolases; EC 3.2.1.91] และ β–Glucosidases (Cellobiases; EC 3.2.1.21) ดังแสดงในภาพที่ 2.2

1) Endoglucanases (C_x) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสไปเป็นกลูโคส เซลโลไบโอส และโอลิโกแซคคาไรด์ โดยจะย่อยสลายด้านในของสายเซลลูโลสแบบสุ่ม (Random)

2) Exoglucanases (C_1) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสและโอลิโกแซคคาไรด์ไปเป็นเซลโลไบโอส โดยจะย่อยสลายด้านปลายของสายเซลลูโลส

3) β-Glucosidases ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสไปเป็นกลูโคส



ภาพที่ 2.2 ขั้นตอนการย่อยสลายเซลลูโลส

ที่มา : หรรษา (2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรรษา (2546) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสเพื่อใช้เสริมในอาหารสัตว์สำหรับช่วยย่อยองค์ประกอบของอาหารสัตว์บางประเภททำให้สัตว์มีการย่อยอาหารได้ดีขึ้น เมื่อนำเชื้อรา *Trichoderma reesei* มาเลี้ยงเพื่อใช้ผลิตเอนไซม์ผสมที่มีทั้งเซลลูเลสและไซแลนเนสโดยใช้วัสดุทางการเกษตร ได้แก่ รำข้าวสาลี รำข้าวเจ้า เปลือกถั่วลิสงและชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ารำข้าวสำลี ให้เอนไซม์ไซแลนเนสสูงสุด (23.931 U/ml) ผสมกับเซลลูเลส 0.226 U/ml ขณะที่รำข้าวเจ้า ให้เซลลูเลสสูงสุด (0.656 U/ml) ผสมกับไซแลนเนส 21.708 U/ml ตามด้วยชานอ้อยที่ให้เซลลูเลส 0.367 U/ml ไซแลนเนส 13.409 U/ml และเปลือกถั่วลิสงที่ให้เซลลูเลส 0.263 U/ml ไซแลนเนส 2.001 U/ml การเติมสารกระตุ้นพวก xyloside มีส่วนช่วยเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้ดีขึ้น ถึง 5.32 เท่า ทำให้สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงถึง 105.847 U/ml โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นวัตถุดิบในการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 กากสับปะรดพันธุ์ศรีราชาที่เหลือจากการคั้นน้ำออกแล้วและ เปลือกสับปะรดสดพันธุ์ศรีราชา

3.1.2 กากสับปะรดพันธุ์ศรีราชาอบแห้ง

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1 Yeast Malt Agar ยี่ห้อ MERCK

3.2.2 Yeast Malt Broth ยี่ห้อ MERCK

3.2.3 Lactobacillus MRS Agar ยี่ห้อ MERCK

3.2.4 Lactobacillus MRS Broth ยี่ห้อ MERCK

3.3 สารเคมี

3.3.1 Congo red

3.3.2 Sodium chloride

3.3.3 Acetic acid

3.3.4 Nelson reagent

3.3.5 Alkaline copper reagent

3.3.6 Carboxymethylcellulose(CMC)

3.4 อุปกรณ์

3.4.1 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow) ยี่ห้อ CTL รุ่น 90B7

3.4.2 เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อ (Shaker) ยี่ห้อ CTL รุ่น SI 1

3.4.3 ตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) ยี่ห้อ Scientific รุ่น Series 2000

3.4.4 เครื่องชั่งน้ำหนักละเอียด (Analytical balance) ยี่ห้อ Satorius

3.4.5 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

3.4.6 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ยี่ห้อ Secoman รุ่น Uvikon XS

3.4.7 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) ยี่ห้อ Olympus รุ่น U-PMTVC

3.4.8 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ยี่ห้อ Jouan รุ่น BR4

3.4.9 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ยี่ห้อ Yamoto รุ่น S 300

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 วัสดุ

3.5.1 กระดาษกรองเบอร์ 1

3.5.2 จุกคอร์กเบอร์ 3

3.5.3 จานเลี้ยงเชื้อ

3.5.4 หลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร

3.6 วิธีการทดลอง

3.6.1 การคัดเลือกและศึกษาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส จากมูลโค

3.6.1.1 การแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสจากมูลโค

เก็บตัวอย่างมูลโคจากแหล่งต่างๆ (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครราชสีมา สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง) แหล่งละ 5 ตัวอย่างนำมาเลี้ยงในอาหาร Yeast Malt (YM)Broth ผสม Carboxymethylcellulose (CMC) เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายหลังจากครบ 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างเชื้อในอาหารเหลวมาเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^{-3} 10^{-5} 10^{-7} จากนั้นนำตัวอย่างที่เจือจางมาเลี้ยงบนอาหาร YM agar ผสม CMC โดยใช้เทคนิค Spread plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวๆที่เจริญบนผิวหน้าของอาหารมาคัดแยกต่อโดยใช้เทคนิค Streak plate ลงบนจานอาหาร YM agar ผสม CMC นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อได้โคโลนีเดี่ยวๆ นำไปย้อมแกรมเพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อจากนั้นนำเชื้อที่ได้ Streak ลงบนหลอดอาหารเอียง YM agar ผสม CMC และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.6.1.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส

ศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ cellulase โดยวัดอัตราส่วนขนาดของบริเวณส่วนใสต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (Ratio of the size of CMC hydrolysis zone to colony diameter) ตามวิธีของ Hankin และ Anagnostakis (1975) โดยนำเชื้อที่เจริญบนอาหาร YM agar ผสม CMC มาทำให้เจือจางด้วย สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ปรับเชื้อแบคทีเรียให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.2 จากนั้นปิเปตสารละลายแบคทีเรียที่เจือจางแล้วปริมาตร 80 ไมโครลิตร ลงหลุมที่เจาะด้วยคอร์ก เบอร์ 3 บนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็งปริมาตร 25 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจผลที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี วัดขนาดของโคโลนีใส ด้วยการย้อมสี Congo red (Hendricks และ Doyle, 1995) 15 นาที จากนั้นจึงเทออกและเทสารละลาย โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 จนท้วมจานอาหาร ทิ้งไว้ 15 นาที เทออกและสังเกตบริเวณใส หาอัตราส่วนของบริเวณใสต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี คัดเลือกแบคทีเรียที่ให้ค่าอัตราส่วนขนาดของบริเวณส่วนใส ต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีสูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ซึ่งแสดงว่ามีแนวโน้มที่จะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส นำเชื้อที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายเซลลูโลส Streak ลงบนหลอดอาหารเอียงของ YM agar ผสม CMC นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.6.1.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์จากแบคทีเรียที่ใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลส

ทำการเตรียมกล้าเชื้อโดย นำแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกขั้นแรกในข้อ 3.6.1.2 มาเลี้ยงในอาหาร YM broth ผสม CMC ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เลี้ยงในสภาวะเขย่าโดยใช้ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำกล้าเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ถ่ายลงใน ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร YM broth ที่มีการใส่กระดาษกรองเบอร์ 1 (ขนาด 1x1 เซ็นติเมตร) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างของสารละลายของอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่มีชีวิตโดยนำตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อมาเลี้ยงบนจานอาหาร YM agar ผสม CMC ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ โดยเตรียมสารละลายเอนไซม์ ด้วยการเก็บตัวอย่างสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่อง ปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 9,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บสารละลายส่วนใสไว้ เพื่อนำไปใช้ใน การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่ย่อยกระดาษกรองโดยผสมสารละลายเอนไซม์ 0.25 มิลลิลิตร กับ กระดาษกรอง ขนาด 1x6 เซนติเมตร ในสารละลาย อะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 5.4 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด 5 นาที วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Somogyi-Nelson (1952) โดยเติมสารละลาย อัลคาไลน์คอปเปอร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือด 15 นาที ทำให้เย็นทันที หลังจากนั้นเติมสารละลาย เนลสัน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอีกครั้งแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เปรียบเทียบกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสเพื่อคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพของเอนไซม์ดีที่สุดเพื่อนำไปใช้ศึกษาในขั้นต่อไป

3.6.1.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่มีผลต่อความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรีย

ทำการเตรียมกล้าเชื้อโดย นำแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกขั้นแรกในข้อ 3.6.1.3 มาเลี้ยงในอาหาร YM broth ผสม CMC ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เลี้ยงในสภาวะเขย่าโดยใช้ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1) การศึกษาความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการเจริญ

ใส่กล้าเชื้อแบคทีเรีย ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร YM broth ปริมาตร 90 มิลลิลิตร โดยกำหนดแหล่งคาร์บอนเป็น กากสับปะรด CMC และ Glucose ตามลำดับ เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 8 ชั่วโมง เพื่อหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่มีชีวิตโดยนำตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อมาเลี้ยงบนจานอาหาร Yeast Malt agar ผสม CMC ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเอนไซม์ โดยผสมสารละลายเอนไซม์ (วิธีการเตรียมสารละลายเอนไซม์ตามข้อ 3.4.1.3) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร กับ กระดาษกรอง ขนาด 1x6 เซนติเมตรในสารละลาย อะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 5.4 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Somogyi-Nelson (1952) โดยเติมสารละลาย อัลคาไลน์คอปเปอร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือด 15 นาที ทำให้เย็นทันที หลังจากนั้นเติมสารละลายเนลสัน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอีกครั้งนำไปวัด ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส จากนั้นนำค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดที่วัดได้มาเปรียบเทียบความแตกต่างกันทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS เพื่อคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดเพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

2) การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ

ใส่กล้าเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 9 มิลลิลิตร ลงใน ขวดรูปชมพู่ขนาด ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร YM broth ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนที่คัดเลือกได้จากข้อ 1) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร โดยแปรอุณหภูมิในการบ่มเป็น 37 40 45 50 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 8 ชั่วโมง เพื่อหาปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เชื้อแบคทีเรียที่มีชีวิตโดยนำตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อมาเลี้ยงบนจานอาหาร YM agar ผสม CMC ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเอนไซม์ โดยผสมเอนไซม์ที่สกัดได้ (วิธีการเตรียมสารละลายเอนไซม์ตามข้อ 3.6.1.3) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร กับกระดาษกรองเบอร์ 1 ขนาด 1x6 เซนติเมตรในสารละลาย อะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 5.4 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Somogyi-Nelson (1952) จากนั้นนำค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของแต่ละอุณหภูมิที่วัดได้มาเปรียบเทียบความแตกต่างกันทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS เพื่อคัดเลือกอุณหภูมิเหมาะสมที่สุด เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3) การศึกษาความเป็นกรด-ด่าง ที่มีผลต่อการเจริญ

ใส่กล้าเชื้อ แบคทีเรีย ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ลงใน ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร YM broth ที่มีการใส่กระดาษกรอง เบอร์ 1 (ขนาด 1x1 เซ็นติเมตร) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร โดยแปรความเป็นกรด - เบสของอาหารเป็น 3 4 5 และ 6 ตามลำดับ เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิที่ได้จากข้อ 2) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 8 ชั่วโมง เพื่อหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่มีชีวิตโดยนำตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อมาเลี้ยงบนจานอาหาร YM agar ผสม CMC ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเอนไซม์ โดยผสมเอนไซม์ที่สกัดได้ (วิธีการเตรียมสารละลายเอนไซม์ตามข้อ 3.6.1.3) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร กับ กระดาษกรองเบอร์ 1 ขนาด 1x6 เซนติเมตรในสารละลาย อะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น0.2 โมลาร์ พีเอช 5.4 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Somogyi-Nelson (1952) จากนั้นนำค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด - เบสแตกต่างกันที่วัดได้มาเปรียบเทียบความแตกต่างกันทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS เพื่อคัดเลือกความเป็นกรด - เบสที่เหมาะสมที่สุด เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

83970

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.2 การคัดเลือกและศึกษาจุลินทรีย์ในกลุ่มแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากมูลโค

3.6.2.1 การคัดแยกแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสจากมูลโค

เก็บตัวอย่างมูลโคจากแหล่งต่างๆ (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครราชสีมา สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง) แหล่งละ 5 ตัวอย่างนำมาเลี้ยงในอาหาร MRS ผสม CMC เลี้ยงแบบสภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายหลังจากครบ 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างเชื้อในอาหารเหลวมาเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^{-3} 10^{-5} 10^{-7} จากนั้นนำตัวอย่างที่เจือจางมาเลี้ยงบนอาหาร MRS ผสม CMC โดยใช้เทคนิค Spread plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ ที่เจริญบนผิวหน้าของอาหาร คัดแยกต่อโดยใช้เทคนิค Streak plate ลงบนจานอาหาร MRS ผสม CMC นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อได้โคโลนีเดี่ยว ๆ นำไปย้อมแกรมแล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อพิจารณาดูว่าเป็นเชื้อที่บริสุทธิ์จากนั้นนำเชื้อที่ได้มา Streak ลงบนหลอดอาหารเอียงของ MRS ผสม CMC นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้วิเคราะห์ในขั้นต่อไป

3.6.2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่ม แลกติกแอซิดแบคทีเรีย

ศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส โดยวัดอัตราส่วนขนาดของบริเวณส่วนใสต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี(Ratio of the size of CMC hydrolysis zone to colony diameter) ตามวิธีของ Hankin และ Anagnostakis (1975) โดยนำเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS ผสม CMC มาทำให้เจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 นาโนเมตร ปรับเชื้อแบคทีเรียให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.2 ปิเปตสารละลายแบคทีเรียที่เจือจาง ปริมาตร 85 ไมโครลิตร ลงหลุมที่เจาะด้วยคอร์ก เบอร์ 3 บนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยตรวจวัดผลที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี วัดขนาดของโคโลนีใสด้วยการย้อมสี Congo red (Hendricks และ Doyle, 1995) 15 นาที จากนั้นจึงเทออกแล้ว เทสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ทิ้งไว้ 15 นาที เทออกแล้วสังเกตบริเวณใส หาอัตราส่วนของบริเวณใสต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี คัดเลือกแบคทีเรียที่ให้ค่าอัตราส่วนขนาดของบริเวณส่วนใส ต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีสูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ซึ่งแสดงว่ามีแนวโน้มที่จะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส นำเชื้อที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายเซลลูโลส Streak ลงบนหลอดอาหารเอียงของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

MRS ผสม CMC นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.6.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ของ แลกติกแอซิดแบคทีเรีย ที่ใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลส

การเตรียมกล้าเชื้อโดย นำแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกขั้นแรกในข้อ 3.6.2.2 มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ผสม CMC 18 มิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้ในสภาวะไร้อากาศ จากนั้นใส่กล้าเชื้อแบคทีเรีย ปริมาตร 18 มิลลิลิตร ลงใน ขวด ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวของ MRS ที่มีการใส่ กระดาษกรองเบอร์ 1 จำนวน 2 แผ่น (ขนาด 1x1 เซ็นติเมตร) 180 มิลลิลิตรบ่มทิ้งไว้ในสภาวะไร้อากาศเก็บตัวอย่างของสารละลายของอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 3 ชั่วโมงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อหาปริมาณเชื้อแบคที่เรียที่มีชีวิตโดยนำตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อมาเลี้ยงบนจานอาหาร MRS agar ผสม CMC ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์โดยเตรียมสารละลายเอนไซม์ด้วยการเก็บตัวอย่างสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่อง ปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 9,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บสารละลายส่วนใสไว้เพื่อนำไปใช้ในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่ย่อยกระดาษกรองโดยผสมสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร กับ กระดาษกรองเบอร์ 1 ขนาด 1x6 เซนติเมตร ในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 5.4 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการต้มน้ำเดือด 5 นาที วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Somogyi-Nelson (1952) โดยเติมสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือด 15 นาที ทำให้เย็นทันที หลังจากนั้นเติมสารละลายเนลสันปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอีกครั้งนำไปวัด ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร และหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส เพื่อคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพของเอนไซม์ดีที่สุดไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.6.2.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มแลกติกแอซิดแบคทีเรีย

ทำการเตรียมกล้าเชื้อโดยนำแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกขั้นแรกในข้อ 3.6.2.3 มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ผสม CMC ปริมาตร 18 มิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้ในสภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1) การศึกษาความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการเจริญ

ใส่กล้าเชื้อ แบคทีเรีย ปริมาตร 18 มิลลิลิตร ลงในขวดขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวของ MRS 180 มิลลิลิตรโดยกำหนดแหล่งคาร์บอนเป็น กากสับปะรด CMC และ Glucose ตามลำดับ บ่มในสภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 8 ชั่วโมงเพื่อหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่มีชีวิตโดยนำตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อมาเลี้ยงบนจานอาหาร MRS agar ผสม CMC ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเอนไซม์ โดยผสมเอนไซม์ที่สกัดได้(วิธีการเตรียมสารละลายเอนไซม์เหมือนข้อ 3.6.2.3) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร กับกระดาษกรองเบอร์ 1 ขนาด 1x6 เซนติเมตรใน สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น0.2 โมลาร์ พีเอช 5.4 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มน้ำเดือด 5 นาที วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Somogyi-Nelson (1952) จากนั้นนำค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดที่วัดได้มาเปรียบกันทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS เพื่อคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดเพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

2) การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ

ใส่กล้าเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 18 มิลลิลิตร ลงในขวดขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวของ MRS ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนที่คัดเลือกได้จาก ข้อ 1) 180 มิลลิลิตร โดยแปรผันอุณหภูมิในการบ่มแต่ละขวดทดลองเป็น 37 40 45 50 และ 60 องศาเซลเซียสตามลำดับ บ่มในสภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 8 ชั่วโมง เพื่อหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่มีชีวิตโดยนำตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อมาเลี้ยงบนจานอาหาร MRS agar ผสม CMC ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเอนไซม์ โดยผสมเอนไซม์ที่สกัดได้ (วิธีการเตรียมสารละลายเอนไซม์ตามข้อ 3.4.2.3) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร กับ กระดาษกรองเบอร์ 1 ขนาด 1x6 เซนติเมตรในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 5.4 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด 5 นาที วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Somogyi-Nelson (1952) จากนั้นนำค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของแต่ละอุณหภูมิที่วัดได้มาเปรียบกันทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS เพื่อคัดเลือกอุณหภูมิที่ดีที่สุด เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3) การศึกษาความเป็นกรด-เบส ที่มีผลต่อการเจริญ

ใส่กล้าเชื้อแบคทีเรีย 18 มิลลิลิตร ลงในขวดขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร MRS broth ที่มีการใส่กระดาษกรองเบอร์ 1 จำนวน 2 แผ่น(ขนาด 1x1 เซ็นติเมตร) 180 มิลลิลิตรโดยแปรผันความเป็นกรด-เบส ของอาหารแต่ละขวดการทดลองเป็น 3 4 5 6 ตามลำดับ บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิที่ได้จากข้อ 2) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 8 ชั่วโมง เพื่อหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่มีชีวิตโดยนำตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อมาเลี้ยงบนจานอาหาร MRS agar ผสม CMC ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเอนไซม์ โดยผสมเอนไซม์ที่สกัดได้ (วิธีการเตรียมสารละลายเอนไซม์ตามข้อ 3.6.2.3) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร กับ กระดาษกรองเบอร์ 1 ขนาด 1x6 เซนติเมตรในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 5.4 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด 5 นาที วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Somogyi-Nelson (1952) จากนั้นนำค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็น กรด – เบส แตกต่างกันที่วัดได้มาเปรียบกันทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS เพื่อคัดเลือกความเป็นกรด - เบสที่เหมาะสมที่สุด เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.6.3 การศึกษาระยะเวลาและประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่ผลิตโดยเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

ทำการเตรียมกล้าเชื้อโดยนำแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกขั้นแรกในข้อ 3.6.1.3 และ 3.6.2.3 มาเลี้ยงในอาหารเหลว YM และMRS ผสม CMC ปริมาตร 18 มิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้ในสภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ใส่กล้าเชื้อแบคทีเรีย 18 มิลลิลิตร ลงในขวดขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารYM และMRS broth ที่มีแหล่งคาร์บอนและความเป็นกรด-เบส และบ่มที่อุณหภูมิตามที่ได้จากการทดลองที่ 3.6.1 และ 3.6.2 เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเก็บตัวอย่างที่เวลา 0 3 6 9 12 24 36 48 72 120 และ 168 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเอนไซม์ โดยผสมเอนไซม์ที่สกัดได้ (วิธีการเตรียมสารละลายเอนไซม์ตามข้อ 3.6.2.3) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร กับ กระดาษกรองเบอร์ 1 ขนาด 1x6 เซนติเมตรใน สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 5.4 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด 5 นาที วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Somogyi-Nelson (1952)

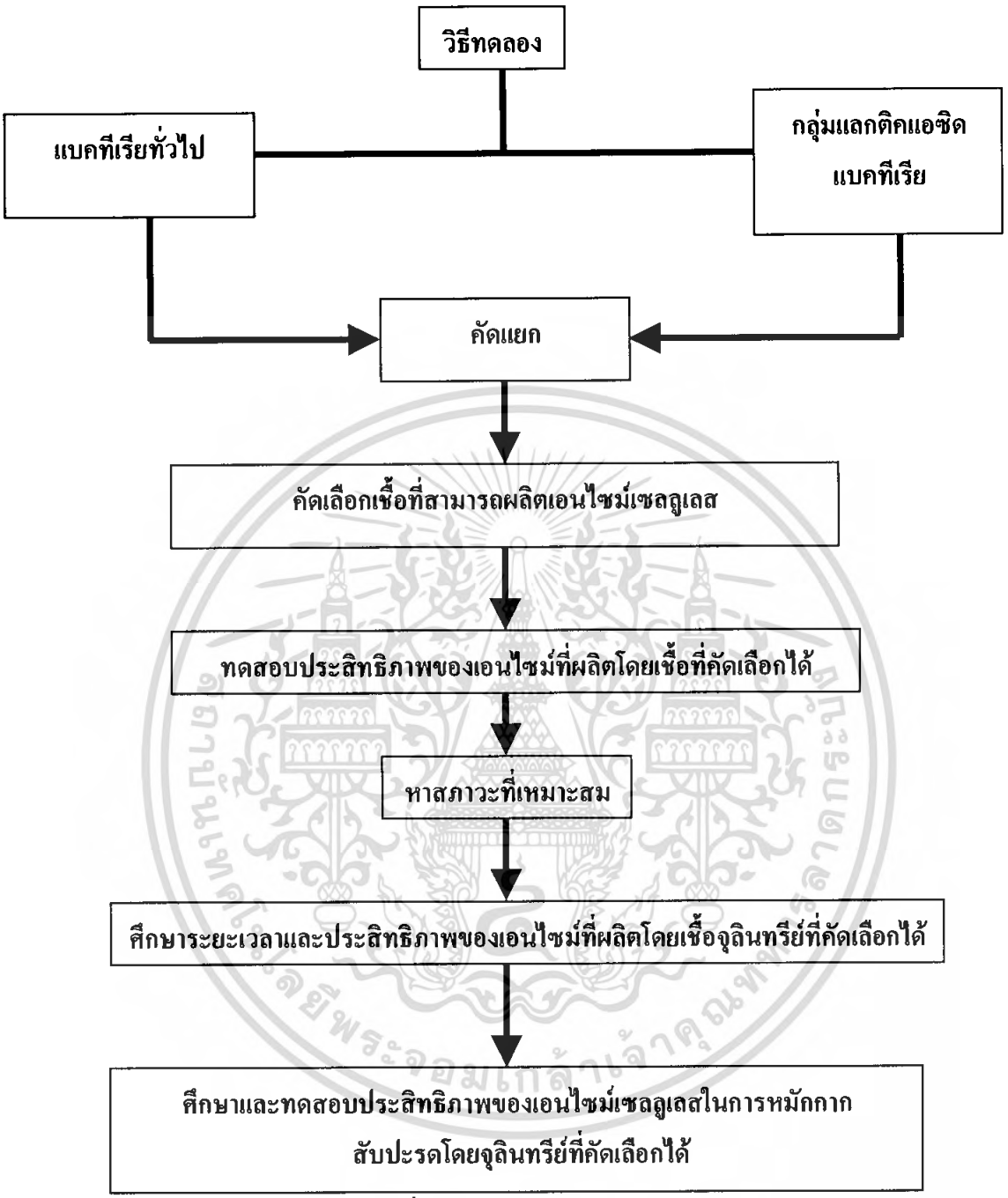
3.6.4 การศึกษาและทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลสในการหมักกากสับปะรดโดยจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

เตรียมกากสับปะรดสดโดยนำสับปะรดพันธุ์ศรีราชามาปลอกเปลือกและนำไปบีบเอาน้ำออกด้วยเครื่องบีบน้ำผลไม้ระบบไฮโดรลิค จากนั้นนำกากสับปะรดที่ได้และเปลือกสับปะรดมาสับให้ละเอียด ปริมาณปริมาณ 300 กรัม นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นถ่ายสารละลายเซลล์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ลงในอาหารสัตว์ นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิบรรยากาศเป็นเวลา 30 วัน ทำการเก็บตัวอย่างกากสับปะรด ทุก 6 ชั่วโมงในวันแรก หลังจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นั้นเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมงจนถึงวันที่ 3 และหลังจากนั้นทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 7 10 15 20 25 และ30 วันเพื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลส โดยวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Somogyi-Nelson (1952)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.1 แผนผังการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ย่อยเซลลูโลสจากแหล่งต่างๆ

ทำการเก็บตัวอย่าง มูลโค ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YMB ผสม CMC และอาหาร MRS ผสม CMC จำนวน 5 ตัวอย่าง เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่ได้จากการเลี้ยงมาทำการแยกเชื้อ ด้วยวิธี spread plate โดยทำการเจือจางตัวอย่างที่ $10^{-6} - 10^{-8}$ ลงบนอาหาร YMA ผสม CMC และอาหาร MRS ผสม CMC บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24และ 48 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเดี่ยวๆ ที่มีลักษณะแตกต่างกันมาเลี้ยงในอาหาร YMA ผสม CMC และอาหาร MRS ผสม CMC โดยวิธีการ streak plate ได้จำนวนแบคทีเรียทั้งสิ้น 133 สายพันธุ์ที่แยกได้จากตัวอย่างที่เก็บมาทั้งหมด 5 ตัวอย่าง โดยให้รหัส I_1- I_{10} II_1 - II_{14} III_1 - III_{12} IV_1 - IV_{12} และ V_1 - V_{10} เป็นตัวอย่างจากอาหารเลี้ยงเชื้อ YMB ผสม CMC ส่วนรหัส $A_1 - A_{12}$ $B_1 - B_{10}$ $C_1 - C_{12}$ $D_1 - D_{11}$ และ $E_1 - E_{30}$ เป็นตัวอย่างจากอาหาร MRS ผสม CMC

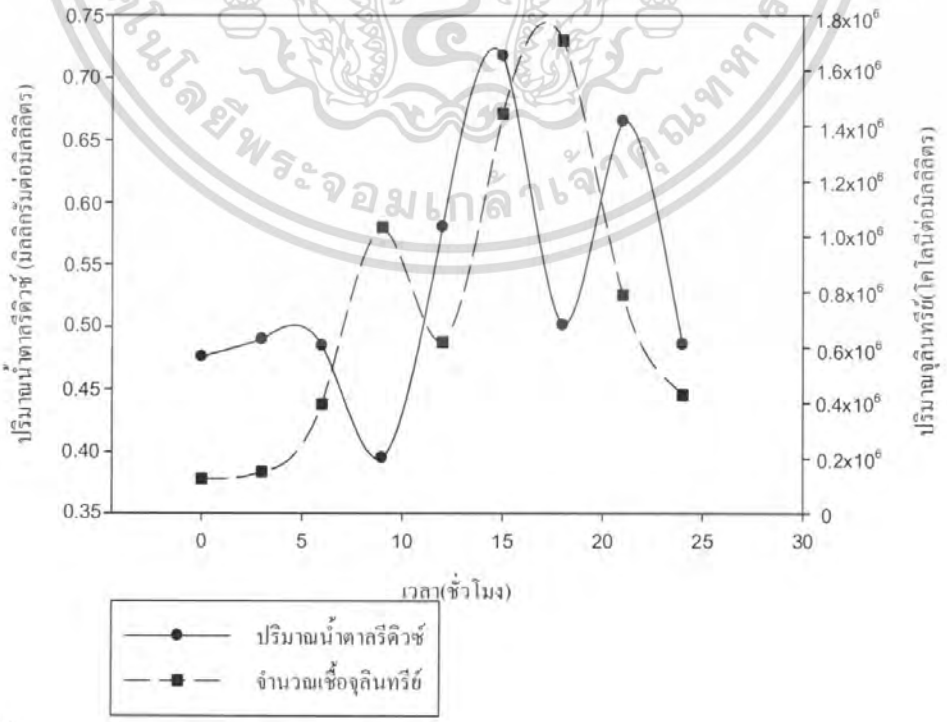
4.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส

(1) การคัดเลือกขั้นแรก โดยศึกษาบริเวณส่วนใสของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยนำเชื้อที่ทดสอบบนอาหารแข็ง YMA ผสม CMC และอาหาร MRS ผสม CMC โดยการย้อมด้วยสี congo red ถ้าเกิดโซนใสแสดงว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มีแนวโน้มที่จะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส ซึ่งได้แก่เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ II_4 II_5 II_6 II_{12} III_4 IV_9 V_7 V_{11} และ V_{17} จากอาหาร YM ผสม CMC และสายพันธุ์ B_2 C_6 E_1 E_3 E_7 E_{21} E_{23} E_{24} E_{26} และ E_{28} จากอาหาร MRS ผสม CMC นำเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกมาศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส โดยวัดอัตราส่วนของบริเวณส่วนใส ต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี คัดเลือกแบคทีเรียที่ให้ค่าอัตราส่วนขนาดของบริเวณส่วนใสต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีที่สูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ แสดงถึงการมีแนวโน้มในการย่อยสลายเซลลูโลสของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ และจากการศึกษาอัตราส่วนใสของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ และได้คัดเลือกแบคทีเรียที่มีบริเวณส่วนใสสูงสุดได้แก่แบคทีเรียสายพันธุ์ III_4 IV_9 V_7 C_5และ E_{28} เพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

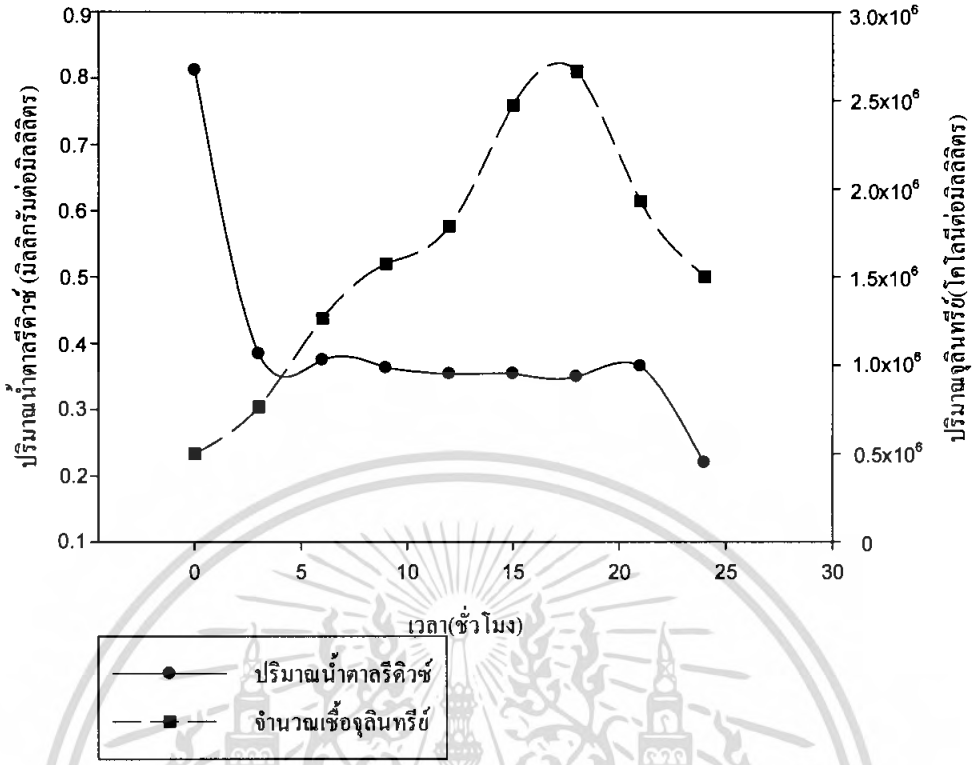
รูปที่ 4.1 รูปแสดงการทดสอบการย่อยเซลลูโลสในอาหารแข็ง

(2) การคัดเลือกขั้นที่สอง นำแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ มาศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ที่ย่อยกระดาษกรองโดยการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณจุลินทรีย์ ทุก 3 ชั่วโมงเป็นเวลา 24 ชั่วโมงในส่วนของอาหาร YMB ผสม CMC และ 48 ชั่วโมงในส่วนของอาหาร MRS ผสม CMC จากนั้นนำผลของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้มาเปรียบเทียบเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีที่สุดมาทดสอบในขั้นต่อไป ซึ่งกิจกรรมการย่อยเซลลูโลสและผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลสได้แสดงในภาพต่อไปนี้

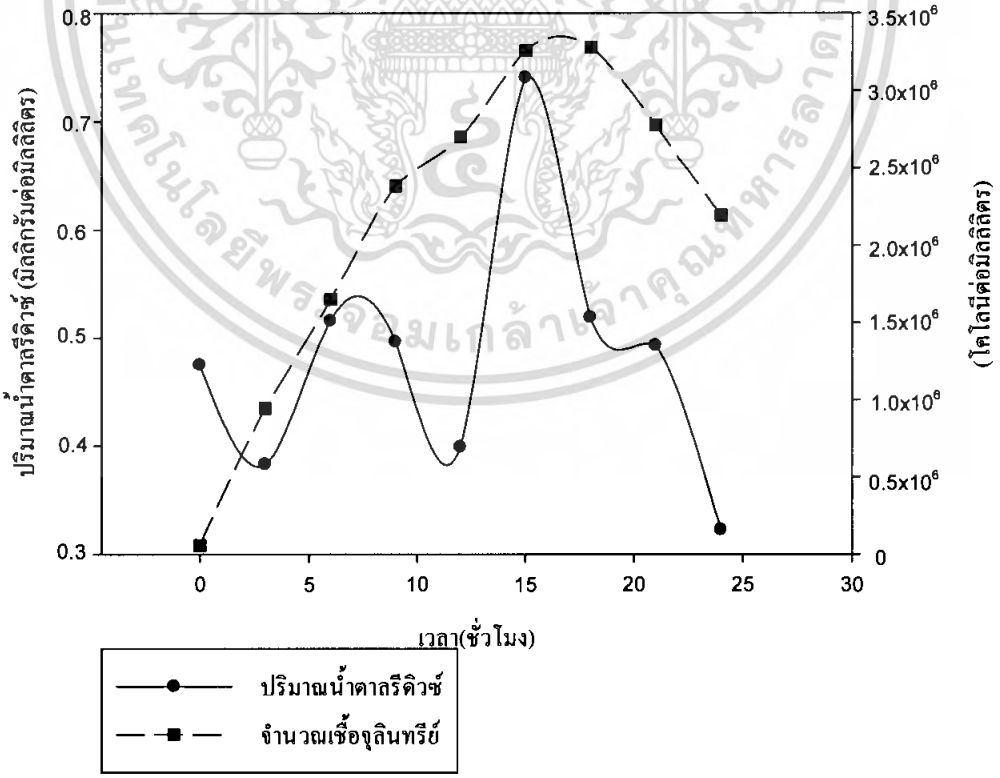


รูปที่ 4.2 กิจกรรมการย่อยเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ III$_4$ ที่เวลาต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

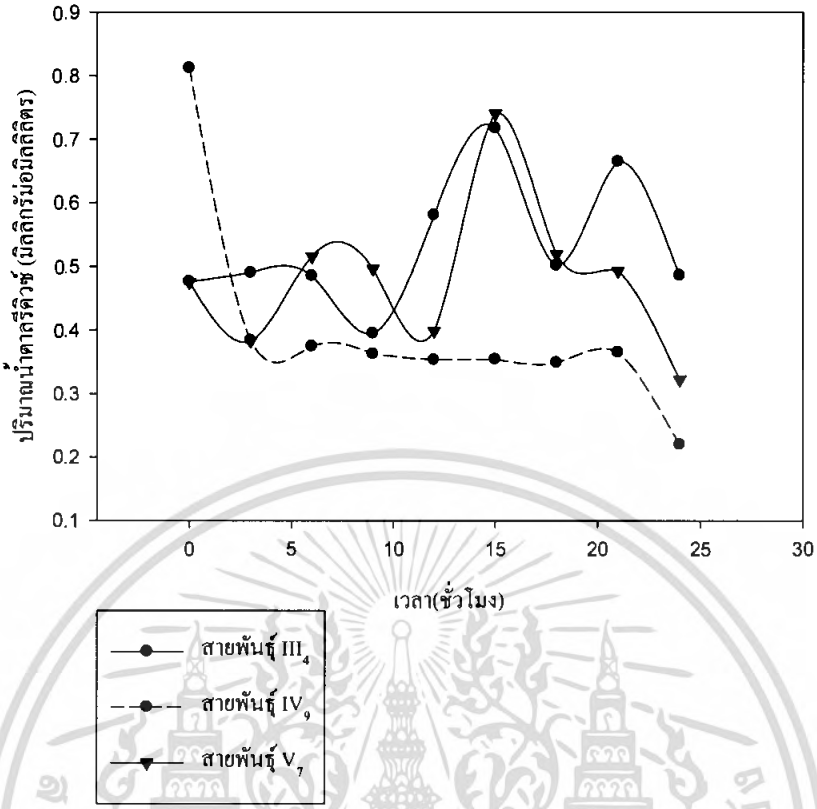


รูปที่ 4.3 กิจกรรมการย่อยเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ IV_7ที่เวลาต่างๆ



รูปที่ 4.4 กิจกรรมการย่อยเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ V_7ที่เวลาต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 เปรียบเทียบประสิทธิภาพเอนไซม์เซลลูโลสของจุลินทรีย์สายพันธุ์ III_4 IV_9และ V_7

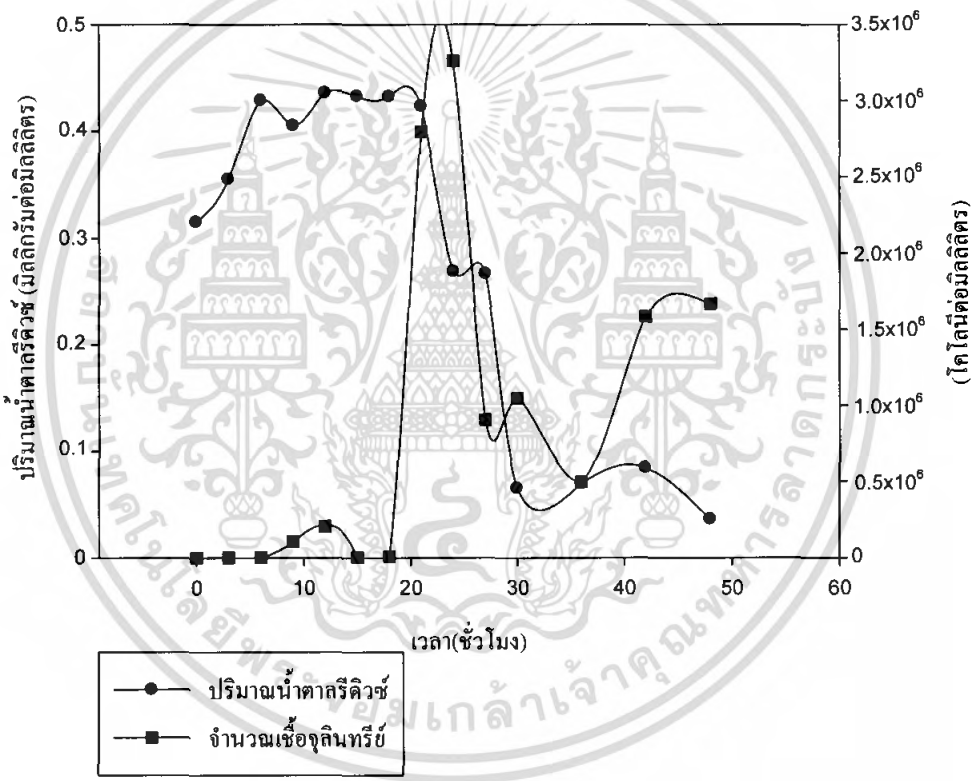
จากผลปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ III_4 IV_9และ V_7 พบว่าสายพันธุ์ III_4 และ V_7จะมีปริมาณสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 15 คือ 0.7175 และ 0.7405 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับในขณะที่สายพันธุ์ IV_9 จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 3 และลดลงเล็กน้อยจนถึงชั่วโมงที่ 24 และเพื่อคัดเลือกสายพันธ์ที่มีประสิทธิภาพของเอนไซม์ดีที่สุดจึงนำปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่เปลี่ยนแปลงจากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นของแต่ละสายพันธุ์มาเปรียบเทียบทางสถิติพบว่า สายพันธุ์ III_4 และ V_7 มีค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่แตกต่างจากสายพันธุ์ IV_9 จึงคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ III_4 และV_7ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลสูงเพื่อทำการทดสอบในขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 เปรียบเทียบทางสถิติของประสิทธิภาพเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ III_4 IV_9และ V_7

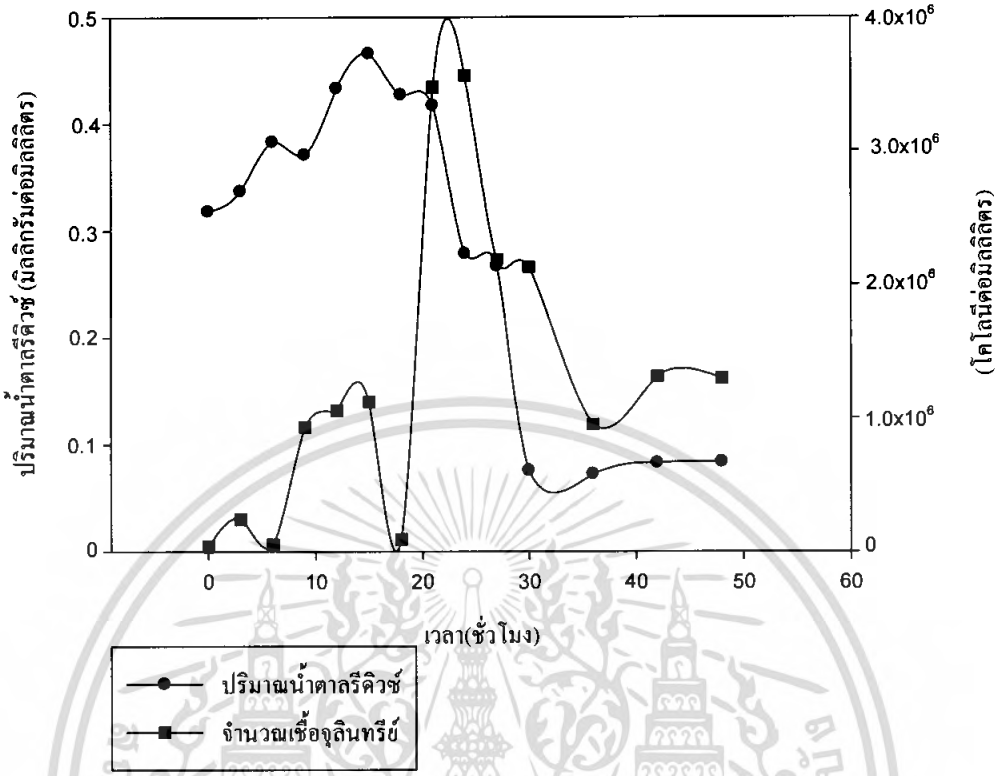
สายพันธุ์	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์(ยูนิต)
III_4	0.2560^b	$9.48x10^{-5}$
IV_9	-0.4470^a	$-1.65 x10^{-4}$
V_7	0.2655^b	$9.83x10^{-5}$

หมายเหตุ : อักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่4.6 กิจกรรมการย่อยเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ C_5 ที่เวลาต่างๆ

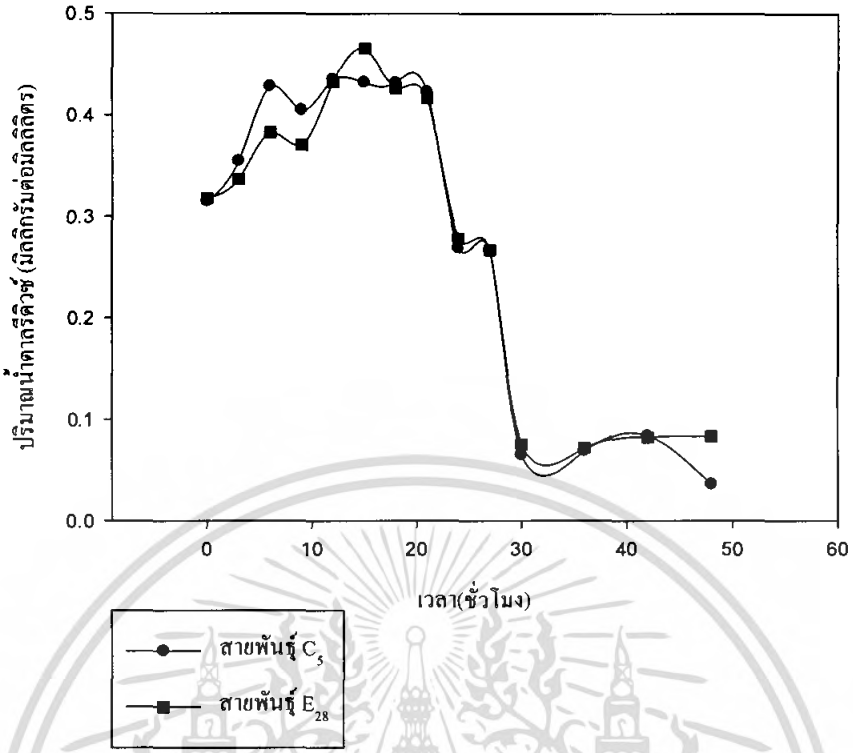
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 กิจกรรมการย่อยเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ E_{28} ที่เวลาต่างๆ

เมื่อนำผลปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสายพันธุ์ C_5 และE_{28}มาเปรียบเทียบกันเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสดีที่สุด พบว่าที่ชั่วโมงที่ 15 แบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด โดยสายพันธุ์ E_{28} มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าสายพันธุ์ C_5 ดังแสดงในรูปที่ 4.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 เปรียบเทียบประสิทธิภาพเอนไซม์เซลลูโลสของจุลินทรีย์สายพันธุ์ C_5และ E_{28}

จากผลปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ C_5และ E_{28}พบว่าสายพันธุ์ C_5 และ E_{28}จะมีปริมาณสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 15 คือ 0.4325 และ 0.4656 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และเพื่อคัดเลือกสายพันธ์ที่มีประสิทธิภาพของเอนไซม์ดีที่สุดจึงนำปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่เปลี่ยนแปลงจากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นของแต่ละสายพันธุ์มาเปรียบเทียบทางสถิติพบว่า สายพันธุ์ C_5และ E_{28} มีค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จึงคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ E_{28} ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลสูงเพื่อทำการทดสอบในขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.2 เปรียบเทียบทางสถิติของประสิทธิภาพเอนไซม์เซลลูเลสจากแลกติกเอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ C_5และ E_{28}

สายพันธุ์	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์(ยูนิต)
C_5	0.1175^b	$4.35x10^{-5}$
E_{28}	0.1476^a	$5.46x10^{-5}$

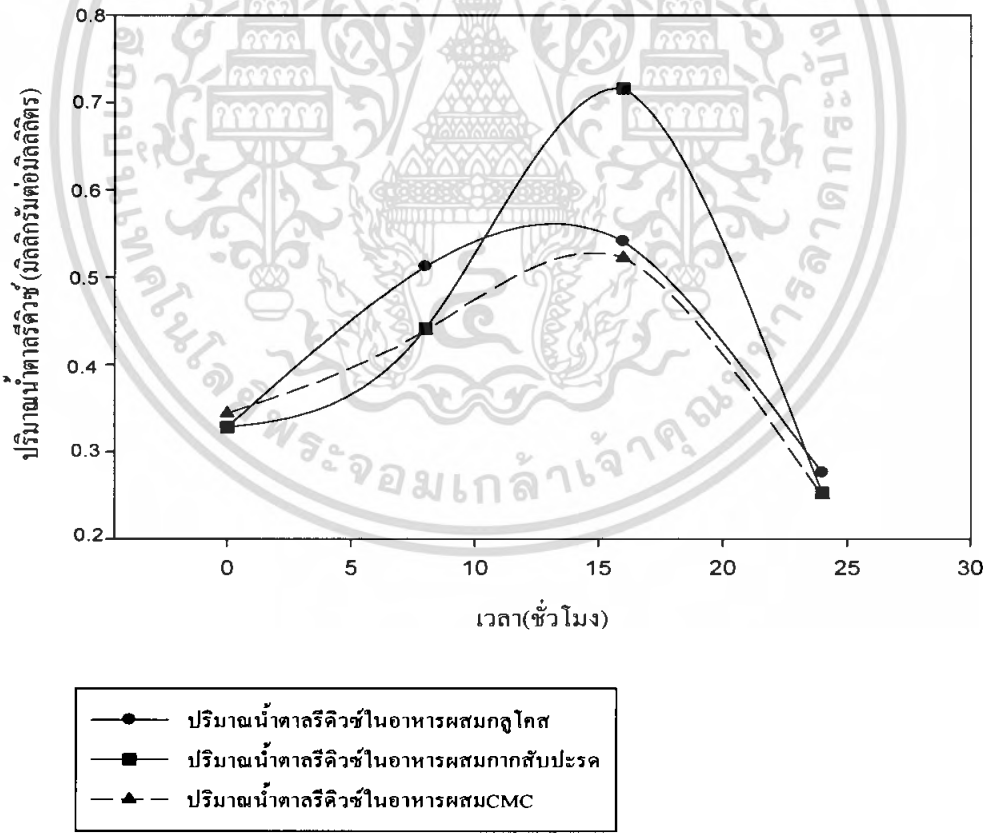
หมายเหตุ : อักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสของแบคทีเรียสายพันธุ์ III_4 V_7 และE_{28}

4.3.1 แหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการย่อยสลายเซลลูโลส

จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ III_4 V_7 และE_{28}ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 3 ชนิดคือ น้ำตาลกลูโคส กากสับปะรด และCMC เพื่อหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมการย่อยสลายเซลลูโลสของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ III_4 V_7 และE_{28}พบว่าแหล่งคาร์บอนที่ให้กิจกรรมการย่อยสลายเซลลูโลสสูงสุด คือ กากสับปะรด โดยวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวส์สูงสุดที่เปลี่ยนแปลงจากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นได้เท่ากับ 0.334 0.421และ 0.1191 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาน้ำตาลกลูโคส วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ได้เท่ากับ 0.213 0.240และ 0.094 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและCMC วัดปริมาณน้ำตาล รีดิวส์ได้เท่ากับ 0.178 0.24และ 0.082 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลที่ได้การที่กากสับปะรดเป็นแหล่งคาร์บอนที่ทำให้เชื้อจุลินทรีย์มีกิจกรรมของเอนไซม์ดีที่สุดอาจเป็นเพราะในกากสับปะรดซึ่งเป็นวัตถุดิบจากธรรมชาติ จะมีองค์ประกอบของสารต่างๆที่ช่วยในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เช่น โปรตีน และวิตามิน เป็นต้น



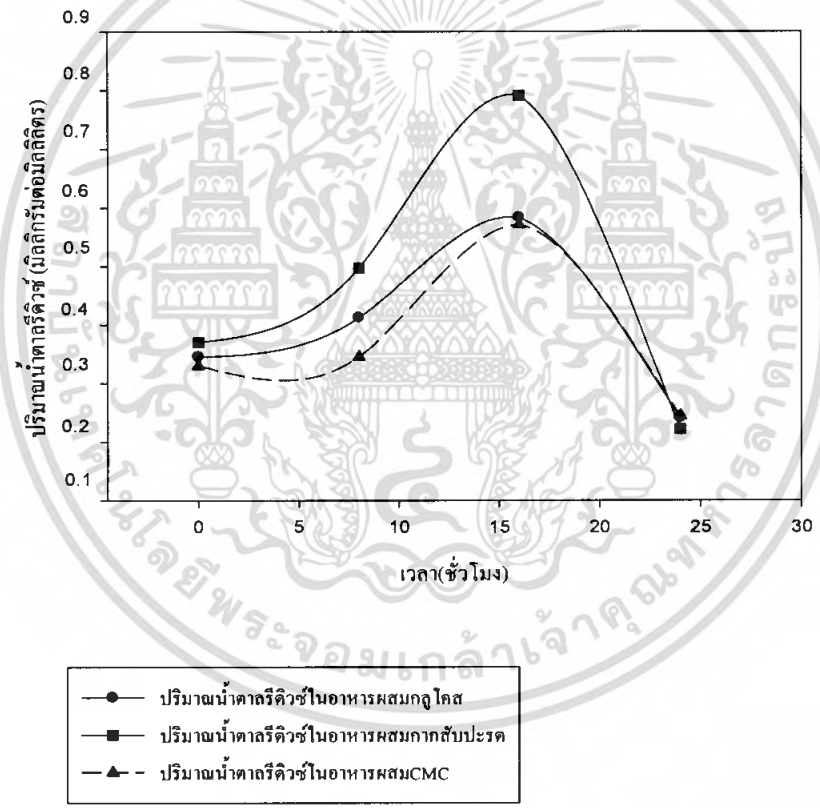
รูปที่ 4.9 ปริมาณน้ำตาลในแหล่งคาร์บอนต่างๆของแบคทีเรียสายพันธุ์ III_4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 เปรียบเทียบทางสถิติของประสิทธิภาพเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ III_4 ใน อาหาร YM ผสม กลูโคส กากสับปะรด และ CMC

แหล่งคาร์บอน	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์(ยูนิต)
กลูโคส	0.2130^{b}	$7.88x10^{-5}$
กากสับปะรด	0.3355^{a}	$1.24x10^{-4}$
CMC	0.1780^{c}	$6.59x10^{-5}$

หมายเหตุ : อักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



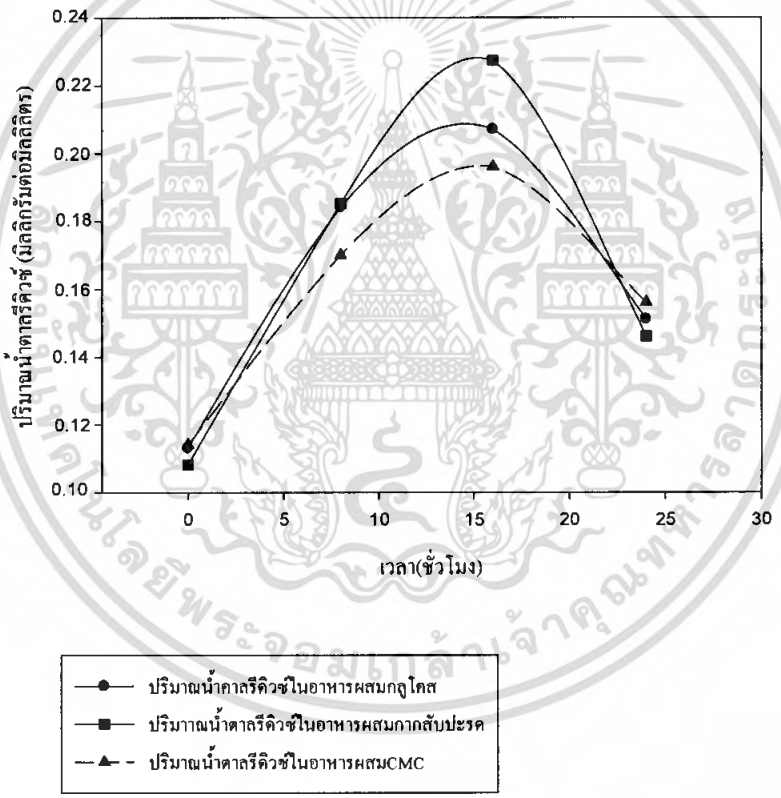
รูปที่ 4.10 ปริมาณน้ำตาลในแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ของแบคทีเรียสายพันธุ์ V_7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบทางสถิติของประสิทธิภาพเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ V_7 ในอาหาร YM ผสม กลูโคส กากสับปะรด และCMC

แหล่งคาร์บอน	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์(ยูนิต)
กลูโคส	0.2400^{b}	$8.88x10^{-5}$
กากสับปะรด	0.4210^{a}	$1.55x10^{-4}$
CMC	0.2400^{b}	$8.88x10^{-5}$

หมายเหตุ : อักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่4.11 ปริมาณน้ำตาลในแหล่งคาร์บอนต่างๆของแบคทีเรียสายพันธุ์E_{28}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

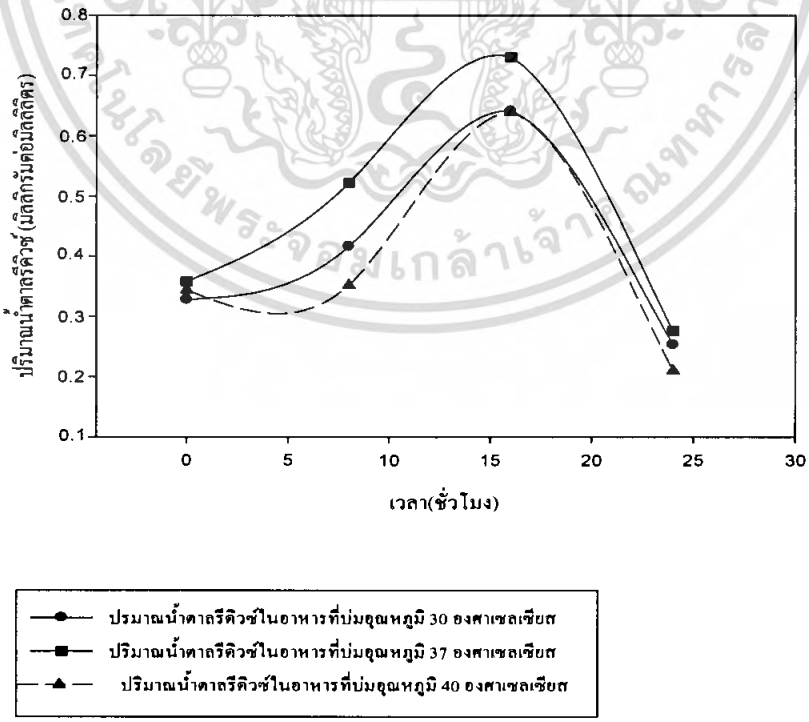
ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบทางสถิติของประสิทธิภาพเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ E_{28} ในอาหาร MRS ผสม กลูโคส กากสับปะรด และ CMC

แหล่งคาร์บอน	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์(ยูนิต)
กลูโคส	0.0940^{b}	$3.48x10^{-5}$
กากสับปะรด	0.1190^{a}	$4.40x10^{-5}$
CMC	0.0805^{c}	$2.96x10^{-5}$

หมายเหตุ : อักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.3.2 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายเซลลูโลส

นำแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหารเหลวโดยเลี้ยงที่อุณหภูมิที่แตกต่างกันคือ แบคทีเรียสายพันธุ์ III_4 และV_7 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 37 และ40 องศาเซลเซียส สายพันธุ์ E_{28} เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 37 40 และ45 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลส ทุก 8 ชั่วโมง พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิต่างๆ จะเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 16 ซึ่งในแบคทีเรียสายพันธุ์ III_4 และV_7 มีกิจกรรมของเอนไซม์ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสขณะที่สายพันธุ์ E_{28} มีกิจกรรมของเอนไซม์ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส



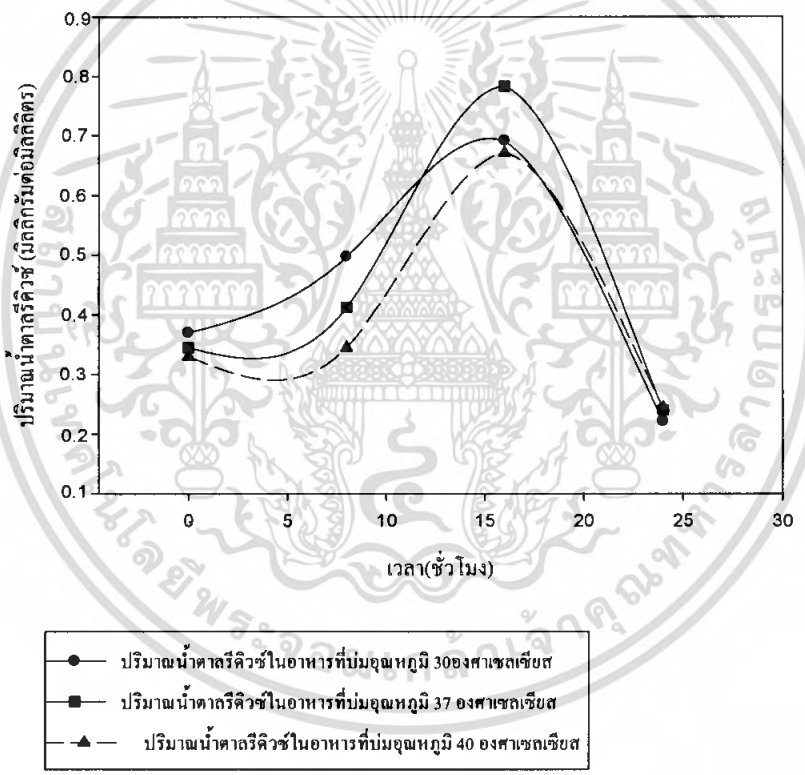
รูปที่4.12 ปริมาณน้ำตาลที่อุณหภูมิต่างๆของแบคทีเรียสายพันธุ์ III_4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบทางสถิติของประสิทธิภาพเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ III_4 ที่อุณหภูมิ 30 37 และ40 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิ(องศาเซลเซียส)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์(ยูนิต)
30	0.313^{b}	$1.15x10^{-4}$
37	0.373^{a}	$1.38x10^{-4}$
40	0.295^{c}	$1.09x10^{-4}$

หมายเหตุ : อักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



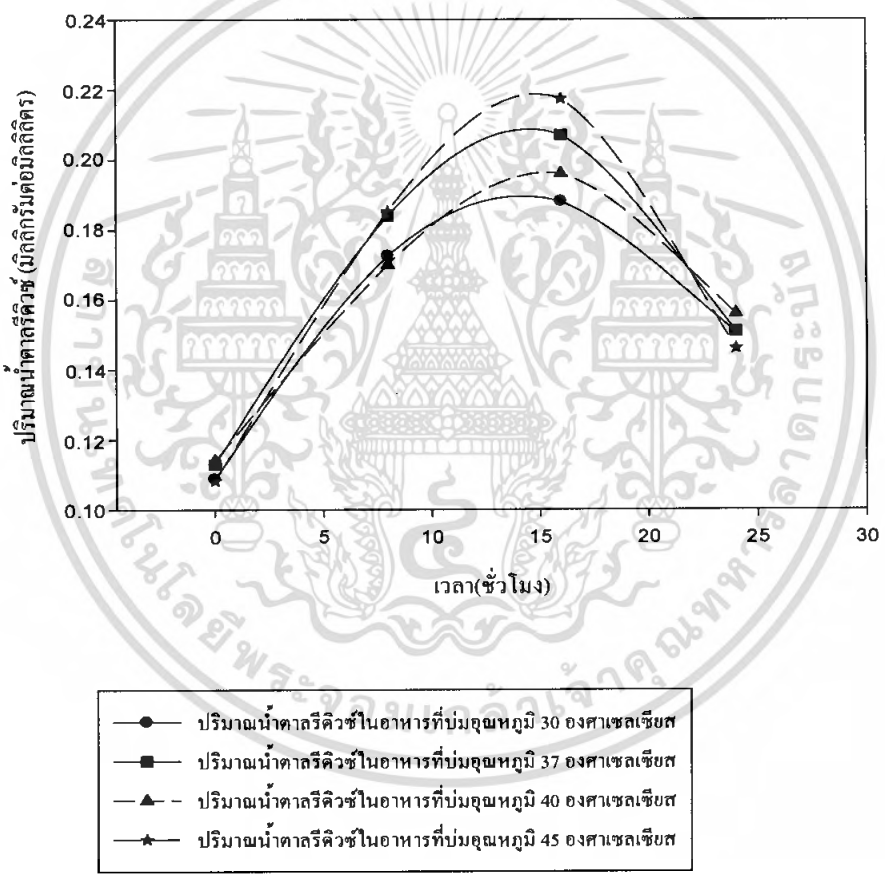
รูปที่ 4.13 ปริมาณน้ำตาลที่อุณหภูมิต่าง ๆ ของแบคทีเรียสายพันธุ์ V_7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 เปรียบเทียบทางสถิติของประสิทธิภาพเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ V_7 ที่อุณหภูมิ 30 37 และ40 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิ(องศาเซลเซียส)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์(ยูนิต)
30	0.3225^{c}	$1.19x10^{-4}$
37	0.4380^{a}	$1.62x10^{-4}$
40	0.3410^{b}	$1.26x10^{-4}$

หมายเหตุ : อักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.14 ปริมาณน้ำตาลที่อุณหภูมิต่างๆของแบคทีเรียสายพันธุ์ E_{28}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

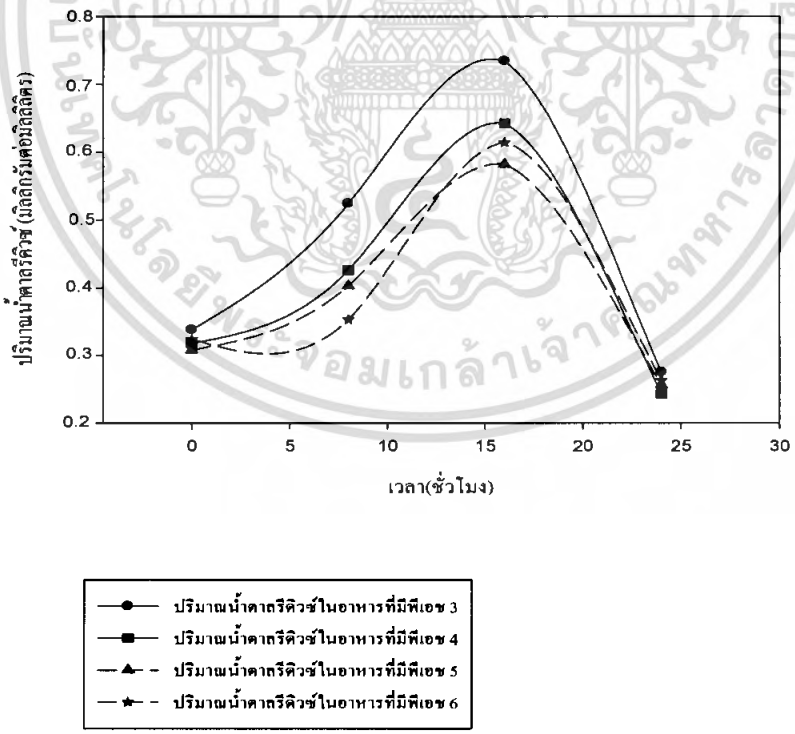
ตารางที่ 4.8 เปรียบเทียบทางสถิติของประสิทธิภาพเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ E_{28} ที่อุณหภูมิ 30 37 และ40 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิ(องศาเซลเซียส)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์(ยูนิต)
30	0.0793^{c}	$2.92x10^{-5}$
37	0.0940^{b}	$3.48x10^{-5}$
40	0.0820^{c}	$3.03x10^{-5}$
45	0.1091^{a}	$4.04x10^{-5}$

หมายเหตุ : อักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.3.3 ความเป็นกรด - เบส ที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายเซลลูโลส

นำแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหารเหลวโดยเลี้ยงที่มีพีเอชแตกต่างกันคือ 3 4 5 และ6 จากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลสทุก 8 ชั่วโมงพบว่าในแบคทีเรียสายพันธุ์ III_4 V_7 และE_{28} มีกิจกรรมของเอนไซม์ดีที่สุดที่พีเอช 3



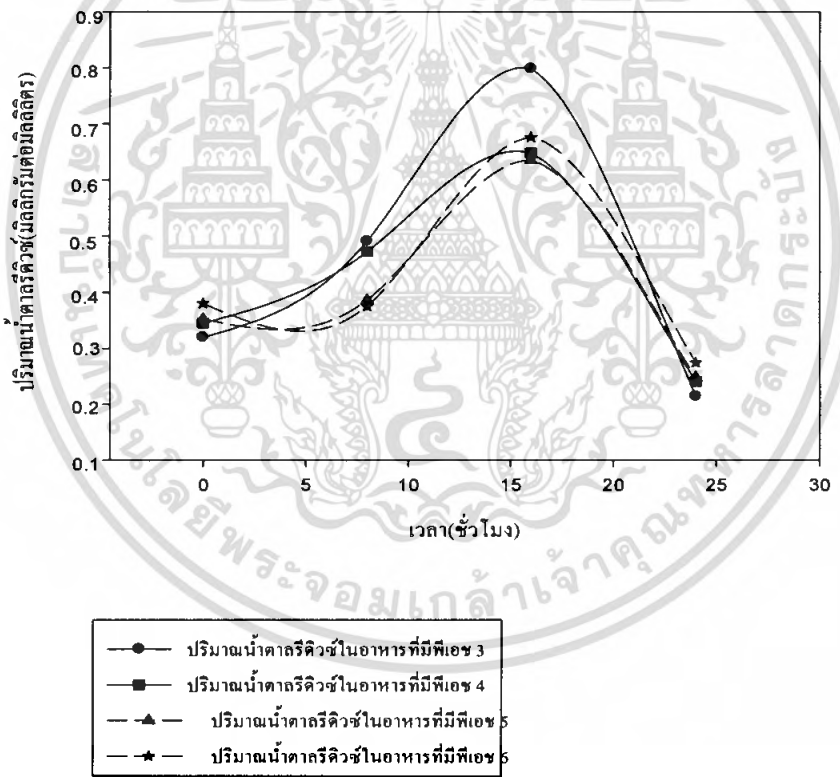
รูปที่ 4.15 ปริมาณน้ำตาลที่พีเอชต่าง ๆ ของแบคทีเรียสายพันธุ์ III_4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 เปรียบเทียบทางสถิติของประสิทธิภาพเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ III_4 ที่พีเอช 3 4 5 และ6

พีเอช	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์(ยูนิต)
3	0.3945^{a}	$1.46x10^{-4}$
4	0.3240^{b}	$1.20x10^{-4}$
5	0.2740^{d}	$1.01x10^{-4}$
6	0.2900^{c}	$1.07x10^{-4}$

หมายเหตุ : อักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



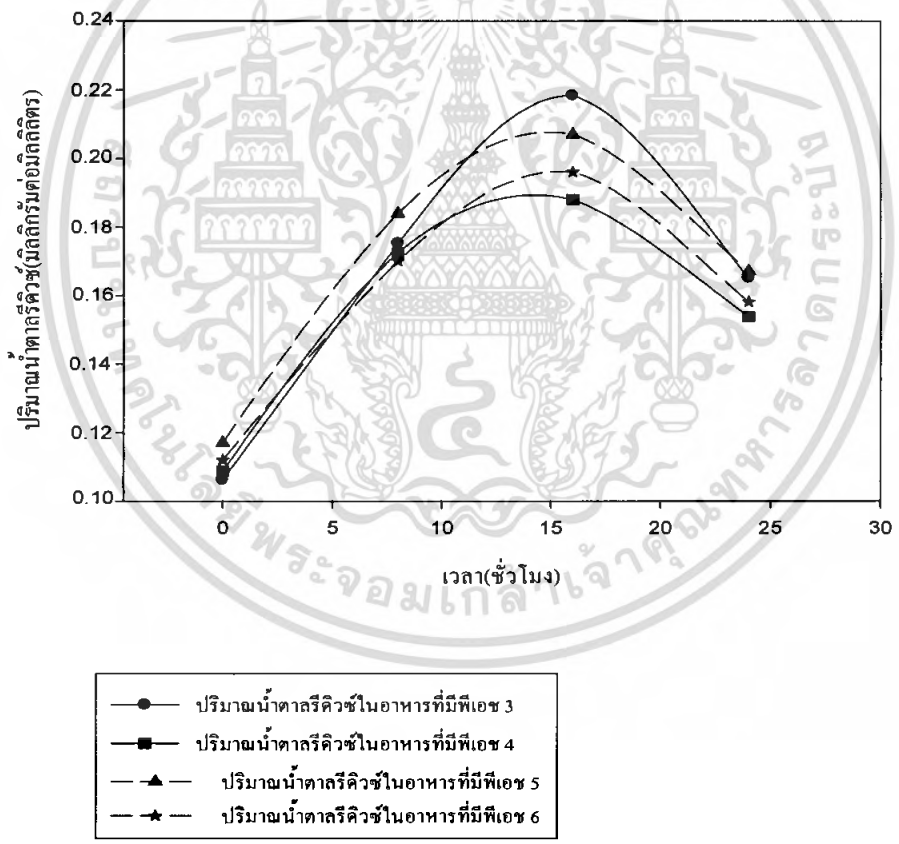
รูปที่ 4.16 ปริมาณน้ำตาลที่พีเอชต่าง ๆ ของแบคทีเรียสายพันธุ์ V_7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 เปรียบเทียบทางสถิติของประสิทธิภาพเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ V_7 ที่ พีเอช 3 4 5 และ6

พีเอช	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์(ยูนิต)
3	0.4790^{a}	$1.77x10^{-4}$
4	0.3030^{b}	$1.12x10^{-4}$
5	0.2830^{d}	$1.04x10^{-4}$
6	0.2960^{c}	$1.09x10^{-4}$

หมายเหตุ : อักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.17 ปริมาณน้ำตาลที่พีเอชต่าง ๆ ของแบคทีเรียสายพันธุ์ E_{28}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 เปรียบเทียบทางสถิติของประสิทธิภาพเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ E_{28} ที่พีเอช 3 4 5 และ6

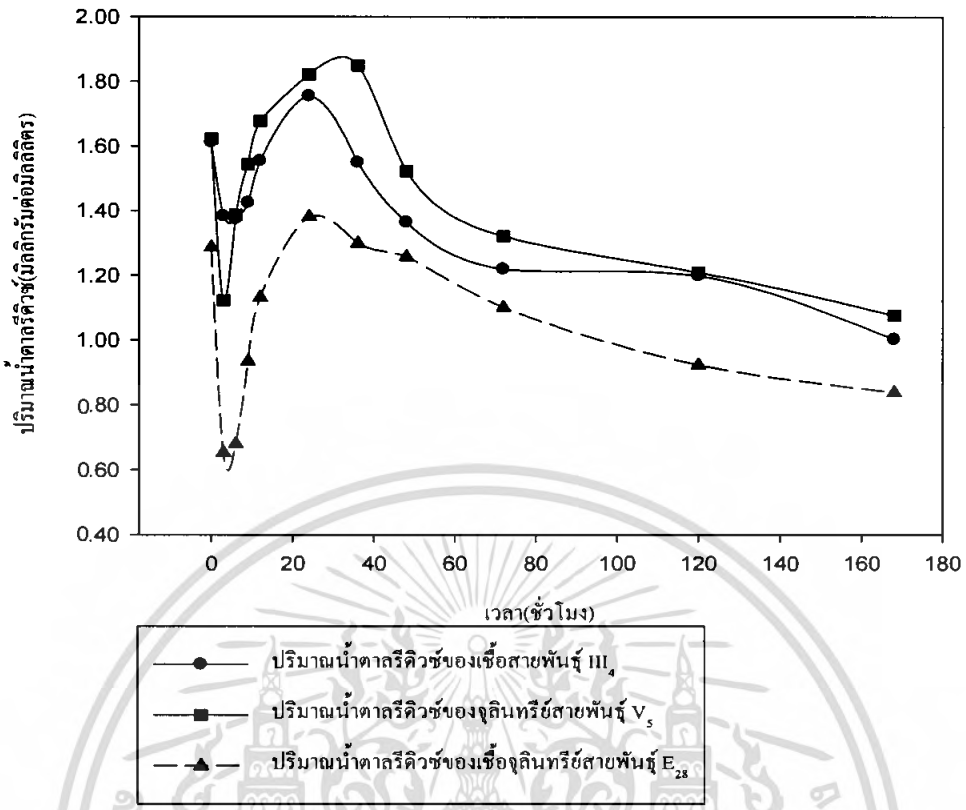
พีเอช	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์(ยูนิต)
3	0.1122[a]	$4.15x10^{-5}$
4	0.0793[d]	$2.93x10^{-5}$
5	0.0900[b]	$3.33x10^{-5}$
6	0.0840[c]	$3.11x10^{-5}$

หมายเหตุ : อักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.4 การศึกษาระยะเวลาและประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่ผลิตโดยเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกสายพันธุ์ III_4 V_5 และE_{28} มาเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและสภาวะตามที่คัดเลือกได้เป็นเวลาหนึ่งสัปดาห์และเก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเอนไซม์ พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์จะลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 3 และจึงเพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 โดยมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 1.74 1.81 และ1.81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงค่อยๆลดลงและค่อนข้างคงที่จนถึงวันสุดท้ายของการหมัก การที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงในช่วงแรกอาจเนื่องมาจากการที่จุลินทรีย์ใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในอาหารเพื่อการเจริญ จึงทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างรวดเร็ว และเมื่อจุลินทรีย์มีปริมาณมากพอจึงมีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสออกมาย่อยเซลลูโลส เป็นกลูโคสปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จึงเพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

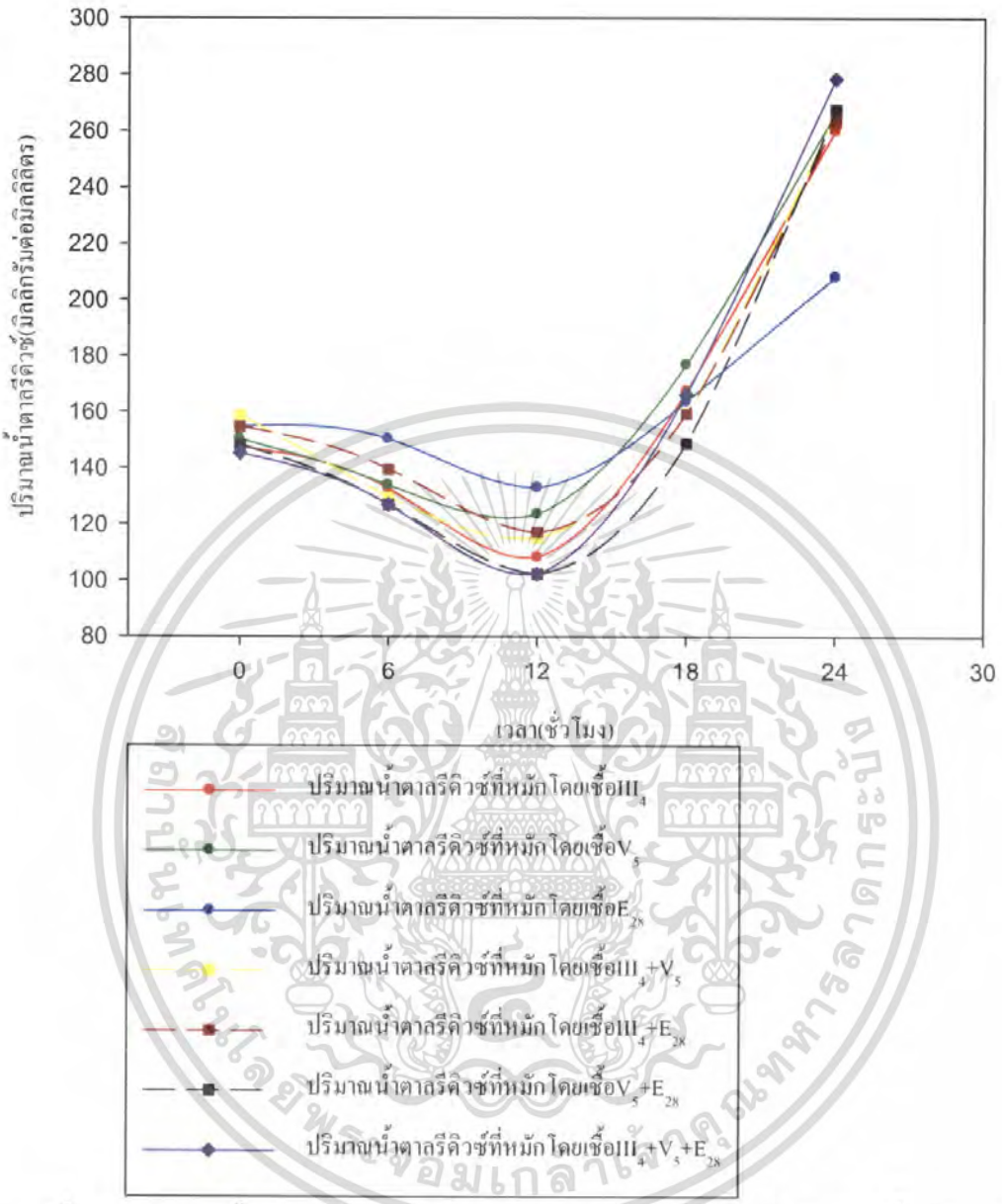


รูปที่ 4.18 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ III_4,V_5และ E_{28}

4.5 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่เชื้อจุลินทรีย์ผลิตได้โดยการหมักกากสับปะรด

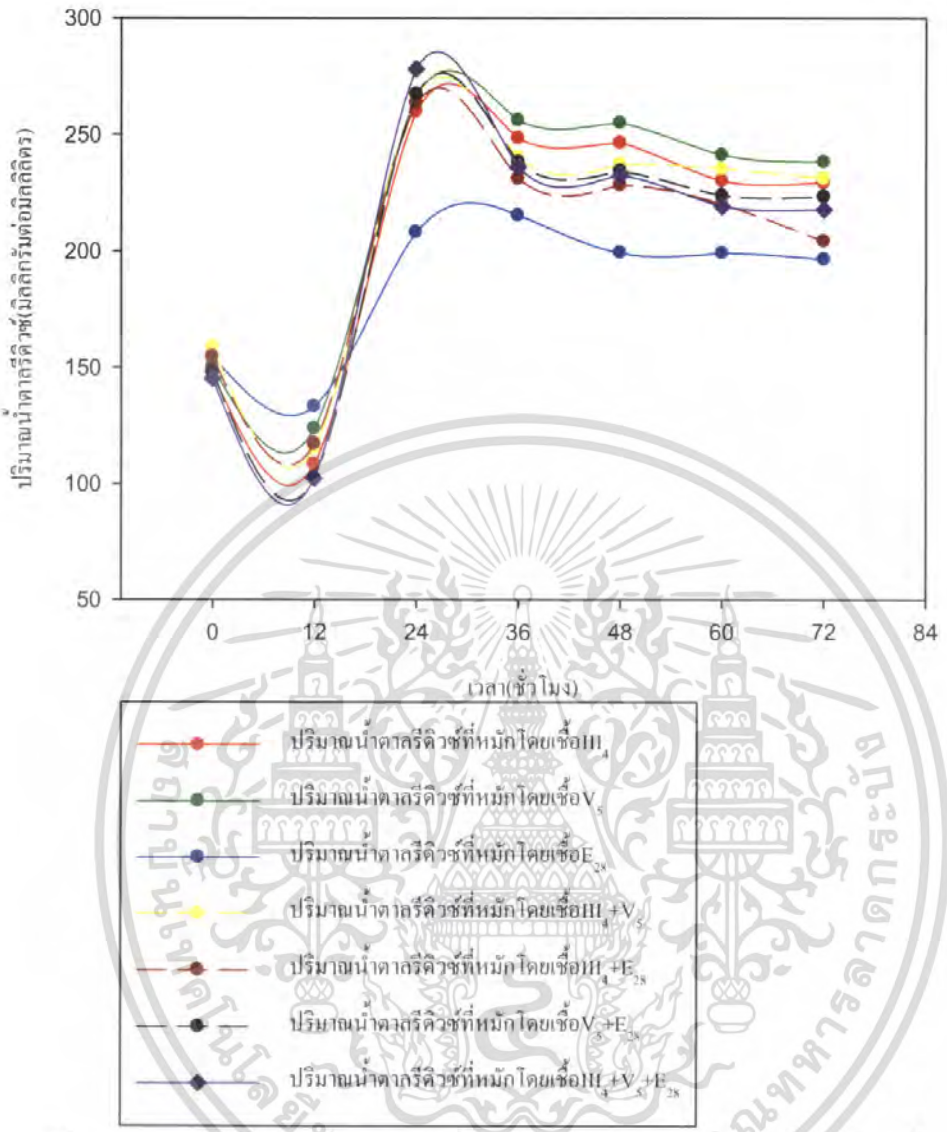
นำเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ III_4 V_5และ E_{28}มาหมักกับกากสับปะรดโดยทำการเลี้ยงเชื้อร่วมกัน7แบบ ดังนี้ แบบที่1 (III_4) แบบที่2 (V_5) แบบที่3 (E_{28}) แบบที่4 (III_4กับ V_5) แบบที่5 (III_4กับE_{28}) แบบที่6 (V_5 กับE_{28})และ แบบที่7 (III_4 V_5 E_{28}) พบว่าในการหมักกากสับปะรดของเชื้อทั้ง 7 แบบ จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 12 ชั่วโมงแรกและจากนั้นจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 และหลังจากชั่วโมงที่ 24 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก็จะค่อยๆลดลงละค่อนข้างคงที่ในช่วงสุดท้ายของการหมัก ดังแสดงใน รูปที่ 4.19 4.20 และ4.21 และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่เปลี่ยนแปลงจากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นของแต่ละแบบพบว่าในการเลี้ยงเชื้อร่วมกันแต่ละแบบจะมีค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์แตกต่างกันโดยที่การเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ E_{28} เพียงสายพันธุ์เดียว จะมีค่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำที่สุด คือ 53.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และการเลี้ยงเชื้อที่มีค่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด คือแบบที่ 7 คือการเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ร่วมกันซึ่งจะมีค่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงถึง 133.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเปรียบค่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของการเลี้ยงเชื้อแต่ละแบบพบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



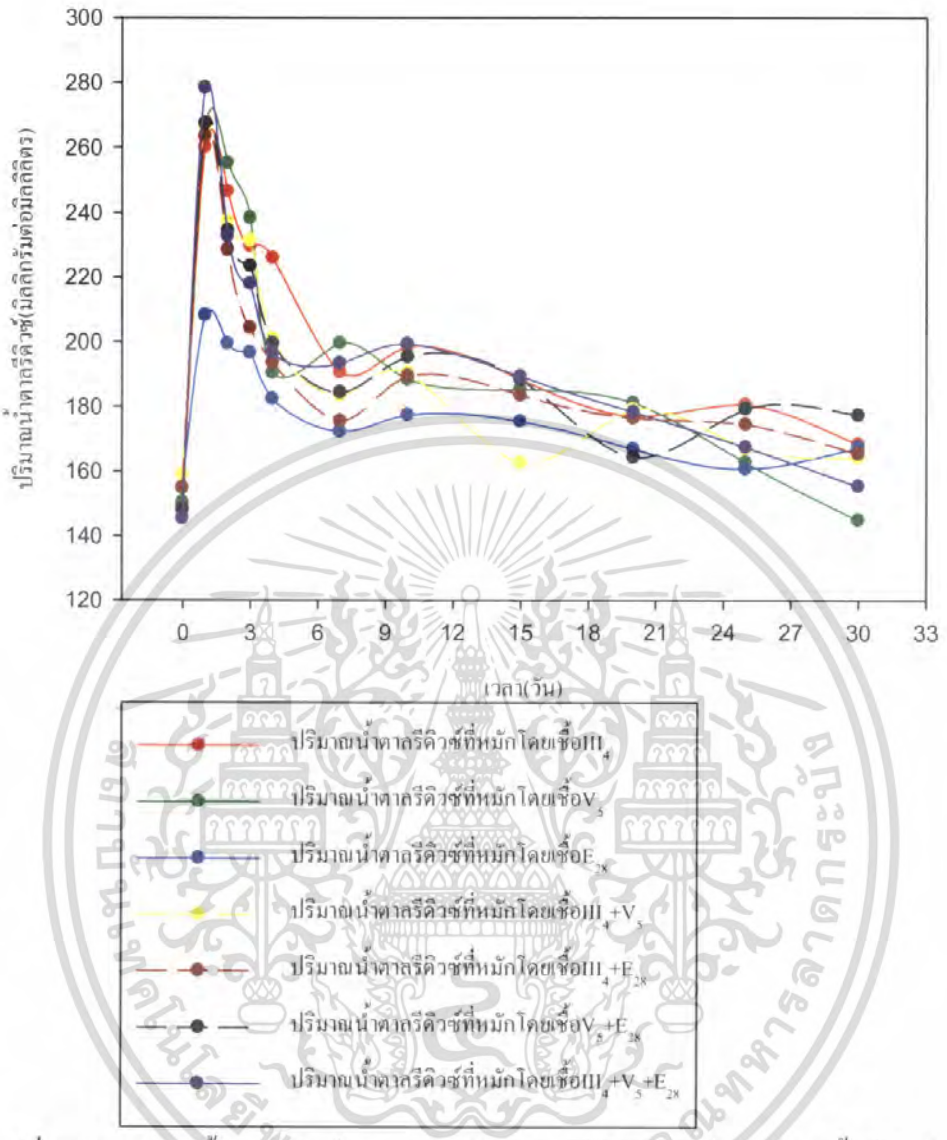
รูปที่ 4.19 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ใน 24 ชั่วโมงแรกของกากสับปะรดที่หมักโดยเชื้อที่คัดเลือกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.20 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ใน 72 ชั่วโมงแรกของกากสับปะรดที่หมักโดยเชื้อที่คัดเลือกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.21 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในเวลา 30 วันของกากสับปะรดที่หมักโดยเชื้อที่คัดเลือกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 เปรียบเทียบทางสถิติของประสิทธิภาพเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ

สายพันธุ์	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต)
III_4	112.48[d]	0.041
V_5	116.15[c]	0.043
E_{28}	53.28[g]	0.019
III_4+V_5	107.51[f]	0.039
$III_4{}^{+}E_{28}$	108.75[e]	0.040
V_5+E_{28}	119.05[b]	0.044
$III_4+V_5+E_{28}$	133.03[a]	0.049

หมายเหตุ : อักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

5.1 ผลการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ย่อยเซลลูโลสจากแหล่งต่างๆ พบว่าได้จำนวนแบคทีเรียทั้งสิ้น 133 สายพันธุ์ที่แยกได้จากตัวอย่างที่เก็บมาทั้งหมด 5 ตัวอย่าง โดยให้รหัส I_1- I_{10} II_1 - II_{14} III_1 - III_{12} IV_1 - IV_{12} และ V_1 - V_{10}เป็นตัวอย่างจากอาหารเลี้ยงเชื้อ YMB ผสม CMC ส่วนรหัส $A_1 – A_{12}$ $B_1 – B_{10}$ $C_1 – C_{12}$ $D_1 – D_{11}$ และ $E_1 – E_{30}$ เป็นตัวอย่างจากอาหาร MRS ผสม CMC

5.2 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส โดยศึกษาบริเวณส่วนใสของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้เชื้อแบคทีเรียที่มีแนวโน้มที่จะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส ได้แก่เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ III_4 IV_9 V_7 C_5 และ E_{28} เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ มาคัดเลือกขั้นที่สอง โดยศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ที่ย่อยกระดาษกรองโดยการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าสายพันธุ์ III_4 และ V_7 จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 15 คือ 0.7175และ 0.7405 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับในขณะที่สายพันธุ์ IV_9 จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 3 และลดลงเล็กน้อยจนถึงชั่วโมงที่ 24

เมื่อนำปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่เกิดจากแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มาเปรียบเทียบทางสถิติพบว่า สายพันธุ์ III_4 และ V_7 มีค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่แตกต่างจากสายพันธุ์ IV_9 และเมื่อศึกษาเปรียบเทียบระหว่าง เชื้อสายพันธุ์ C_5และ E_{28} พบว่า C_5และ E_{28}จะมีปริมาณสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 15 คือ 0.4325 และ 0.4656 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และเมื่อนำปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่เปลี่ยนแปลงจากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นของแต่ละสายพันธุ์มาเปรียบเทียบทางสถิติพบว่า สายพันธุ์ C_5และ E_{28} มีค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลแตกต่างกันจึงคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ III_4 V_7 และ E_{28}เพื่อทำการทดสอบในขั้นต่อไป

5.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายเซลลูโลสของแบคทีเรียสายพันธุ์ III_4 V_7 และE_{28} โดยศึกษา แหล่งคาร์บอน อุณหภูมิ และความเป็นกรด-เบส พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ มี แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมเหมือนกัน คือ กากสับปะรด อุณหภูมิที่เหมาะสม 37 องศาเซลเซียสในเชื้อสายพันธุ์ III_4 V_7 และ 45 องศาเซลเซียส ในเชื้อสายพันธุ์ E_{28} และความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมเท่ากันคือ พีเอช 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.4 ผลการศึกษาระยะเวลาและประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่ผลิตโดยเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากการนำแบคทีเรียที่คัดเลือกสายพันธุ์ III_4 V_5 และE_{28} มาเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและสภาวะตามที่คัดเลือกได้เป็นเวลาหนึ่งสัปดาห์ พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์จะลดลงอย่างรวดเร็ว จนถึงชั่วโมง ที่ 3 และจึงเพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 โดยมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 1.74 1.81 และ1.81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงค่อยๆลดลงและค่อนข้างคงที่จนถึงวันสุดท้ายของการหมัก

5.5 ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่เชื้อจุลินทรีย์ผลิตได้โดยการหมักกากสับปะรด นำเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ III_4 V_5และ E_{28}มาหมักกับกากสับปะรดโดยทำการเลี้ยงเชื้อร่วมกัน7แบบ ดังนี้ แบบที่1 (III_4) แบบที่2 (V_5) แบบที่3 (E_{28}) แบบที่4 (III_4กับ V_5) แบบที่5 (III_4กับE_{28}) แบบที่6 (V_5 กับE_{28})และ แบบที่7 (III_4 V_5 E_{28}) พบว่าในการหมักกากสับปะรดของเชื้อทั้ง 7 แบบ จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 12 ชั่วโมงแรกและจากนั้นจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนสูงที่สุดที่ชั่วโมงที่ 24 และหลังจากชั่โมงที่ 24 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก็จะค่อยๆลดลงละค่อนข้างคงที่ในช่วงสุดท้ายของการหมักและเมื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่เปลี่ยนแปลงจากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นของแต่ละแบบ พบว่าในการเลี้ยงเชื้อร่วมกันแต่ละแบบจะมีค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์แตกต่างกัน โดยที่การเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ E_{28} เพียงสายพันธุ์เดียว จะมีค่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำที่สุด คือ 53.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และการเลี้ยงเชื้อที่มีค่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด คือ แบบที่ 7 คือ การเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ร่วมกัน ซึ่งจะมีค่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงถึง 133.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเปรียบค่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของการเลี้ยงเชื้อแต่ละแบบพบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จึงสรุปได้ว่าการเลี้ยงเชื้อทั้งสามชนิดร่วมกันจะมีประสิทธิภาพมากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กองแผนงาน กรมปศุสัตว์ .2549

จินดา สนิทวงศ์ ณ อยุธยา. 2547. การใช้เศษเหลือและผลพลอยได้จากสับปะรดเป็นอาหารสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้อง . กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์

จินดา สนิทวงศ์ฯ สุทิน ภู่ขวัญเมือง วัชรินทร์ บุญภักดี ประเทศ ปุ้ยพันธวงศ์ อุดร เสนากัลป์ และ ชาญชัย มณีดุลย์. 2528. การใช้เปลือกสับปะรดเป็นอาหารเสริมสำหรับเลี้ยงโคในฤดูแล้ง รายงานผลงานวิจัยสาขาผลิตปศุสัตว์, หน้า 213-233.

จินดา สนิทวงศ์ และปรัชญา ปรัชญลักษณ์. 2542. การใช้จุกสับปะรดเสริมอาหารหยาบสำหรับโครีดนมในฟาร์มเกษตรกรรายย่อย รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2542 กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

จินดา สนิทวงศ์ และอุเทน รุ่งเรือง. 2534. การใช้ต้นและเปลือกข้าวโพดฝักอ่อนเป็นอาหารหลักในโค กำลังรีดนม รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2534 กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวง เกษตรและสหกรณ์

จิราภรณ์ จันทรมา. 2546. บทบาทของเอนไซม์ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์

หรรษา ปุณณะพยัคฆ์.2546.การผลิตเอ็นไซม์จากวัสดุทางการเกษตรเพื่อเป็นแนวทางการใช้ในอาหารสัตว์. ภาควิชาพฤกษศาสตร์คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย

สถิติการเกษตรของประเทศไทย . 2548 . สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร

สมบัติ ตงเต๊า สมเกียรติ นวลละออง ทวีศักดิ์ แสงอุดม ศศิธร วสุนันท์ อานุภาพ ธีรกุล และ นราดล นภาพร้อมจิต. 2539. การรวบรวมพันธุ์และศึกษาพันธุ์สับปะรด รายงานสัมมนาวิชาการสับปะรด ครั้งที่ 2 ประจำปี 2539 กรมวิชาการ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 176 – 205.

Hankin, L. and Anagnostakis, S.L1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycology*, 67: 597-606,

Hendricks, C.W. and Doyle, J.D. 1995 A new solid media for enumerating cellulose-utilizing bacteria in soil. *Appl.Environ. Microbiol.* 61 (5) 2016-2019.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dowell Mc, R.E. 1972. Improvement of Livestock production in warm climate. W.H. Freeman and Company San Fransisico. 711 p

Perez, C.B. and Hsu, C.T.1973. Farm by-products and beef production Fd. Fert. Tech. Cent. Ext. Bull. 32.

Somogyi, M.and Nelson, N.1952. Notes of sugar determination. J. Biol. Chem., 195-19-23.

Udin, B.E. 1978 Background to the Feed Lot. Majuternak TLP Feed Lot SDU. BHD. Malaysia

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหาร Yeast Malt Broth ผสม CMC

เปปโตน (Peptone)	5.0	กรัม
ยีสต์สกัด (Yeast Extract)	3.0	กรัม
มอลท์สกัด(Malt Extract)	3.0	กรัม
คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส (CMC)	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. สูตร Yeast Malt Agar

เปปโตน (Peptone)	5.0	กรัม
ยีสต์สกัด (Yeast Extract)	3.0	กรัม
มอลท์สกัด(Malt Extract)	3.0	กรัม
คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส (CMC)	10.0	กรัม
วุ้น (Agar)	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. สูตรอาหาร MRS

เปปโตน (Peptone)	10.0	กรัม
เนื้อสกัด (Meat Extract)	8.0	กรัม
ยีสต์สกัด (Yeast Extract)	3.0	กรัม
โซเดียมอะซิเตท	5.0	กรัม
ไตรเอมโมเนียมซิเตรท	2.0	กรัม
แมกนิเซียมซัลเฟต	0.2	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต	0.05	กรัม
ทวีน 80 (Tween 80)	1.0	มิลลิลิตร
ซีเอ็มซี (CMC)	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 118 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. สูตรอาหาร MRS Agar

เปปโตน (Peptone)	10.0	กรัม
เนื้อสกัด (Meat Extract)	8.0	กรัม
ยีสต์สกัด (Yeast Extract)	3.0	กรัม
โซเดียมอะซิเดท	5.0	กรัม
ไดรเอมโมเนียมซิเตรท	2.0	กรัม
แมกนิเซียมซัลเฟต	0.2	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต	0.05	กรัม
ทวีน 80 (Tween 80)	1.0	มิลลิลิตร
ซีเอ็มซี (CMC)	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
วุ้น (Agar)	15.0	กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 118 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
วิธีวิเคราะห์ทางเคมี

1. การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส ตามวิธีของ Wood และ MacCrae (1977)

1.1. การเก็บตัวอย่าง

นำแต่ละ Treatment มาชั่งด้วยเครื่องชั่ง โดยชั่ง Treatment ละ 5 มิลลิลิตรใส่ในโกร่งบด เติม Phosphate buffer pH 7 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บดและ กรองเอาแต่น้ำใส่หลอด centrifuge ปริมาณ 10-15 มิลลิลิตร

1.2. การเตรียม crude enzyme

1. เมื่อเก็บตัวอย่างสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 10-15 มิลลิลิตรได้แล้ว นำมาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์ ด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที

2. เก็บสารละลายใสตอนบนซึ่งประกอบด้วย crude enzyme ไว้ใช้ในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสต่อไป

1.3. การวัดปริมาณน้ำตาล

1. การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่ย่อยกระดาษกรอง [Fpase activity] โดยผสมและบ่มสารละลายของ crude enzyme 0.25 มิลลิลิตร กับสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ กระดาษกรอง เบอร์ 1 ขนาด 1×6 เซนติเมตร ใน acetate buffer 0.2 M pH 5.4 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3. หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด 5 นาที

4. นำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Somogyi-Nelson ดังนี้

เติมสารละลายอัลคาไลคอปเปอร์ [Alkaline copper reagent] 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือด 15 นาที ทำให้เย็นทันที หลังจากนั้นเติมสารละลายเนลสัน [Nelson reagent] 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร และหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

เตรียม Stock โดยละลายน้ำตาลบริสุทธิ์ในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 1 % [1 mg/ml = 1000 ppm =0.10 g/ml] ความเป็นน้ำตาลมาตรฐานชนิดโมโนเมอร์ซึ่งเป็นน้ำตาลชนิดเดี่ยวกับตัวอย่างที่ต้องการทราลปริมาณ เช่น ใช้กลูโคสถ้าการหาน้ำตาลนั้นเป็นโมโนเมอร์หรือโอลิโกเมอร์ของกลูโคส หรือให้ไซโลสเป็นน้ำตาลมาตรฐาน ถ้าการหาน้ำตาลนั้นเป็นโมโนเมอร์หรือโอลิโกเมอร์ของไซโลสทำให้น้ำตาลเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ความเข้มข้นต่าง ๆ เช่น 0,20,40,60,80,...,200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ Volumetric flask

ตารางที่ 1-ข แสดงอัตราส่วนสารละลายในการเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคส

ความเข้มข้นกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาตร Stock ที่ปิเปต (มิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	ปริมาตรรวม (มิลลิลิตร)
20	2	98	100
40	4	96	100
60	6	94	100
80	8	92	100
100	10	90	100
120	12	88	100
140	14	86	100
160	16	84	100
180	18	82	100
200	20	80	100

หมายเหตุ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร = 1 ppm

10^4 ppm = 1 %

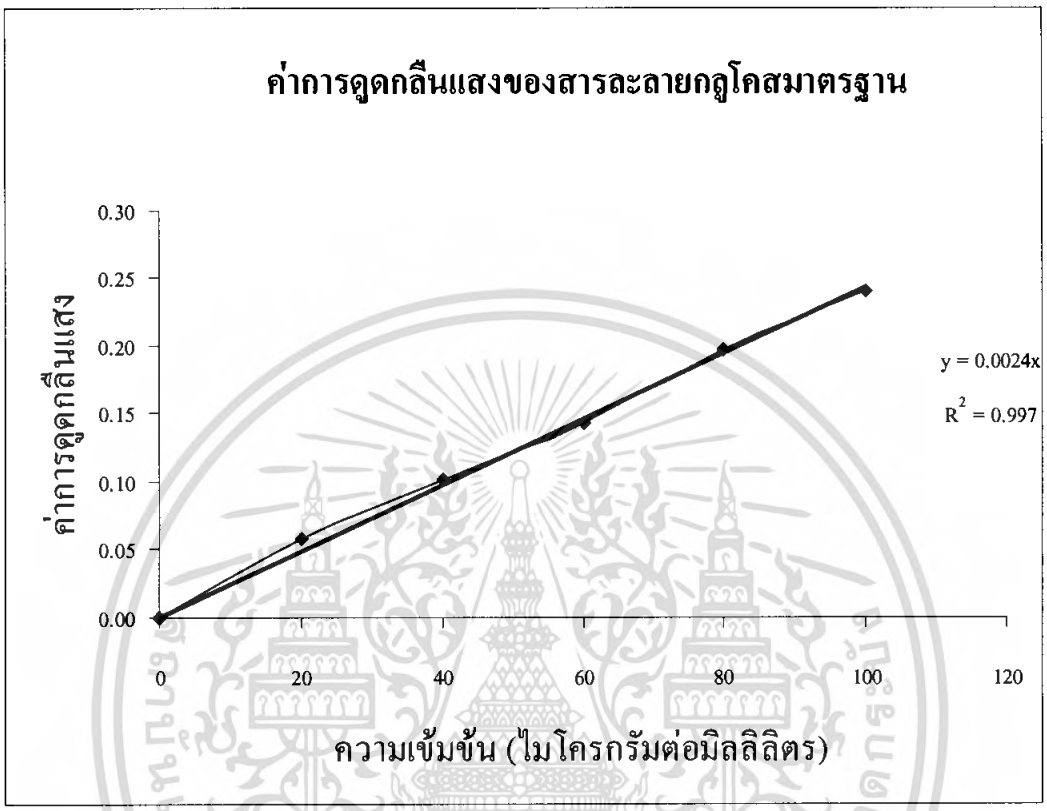
ดังนั้น 10^4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร = 1 %

นำสารละลายน้ำตาล(ในข้อ 2) ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลโดยใช้วิธีเดียวกับการวิเคราะห์น้ำตาล (การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส ตามวิธีของ Wood และ MacCrae) ซึ่งมักทำซ้ำตัวอย่างละ 2-3 ซ้ำนำค่าเฉลี่ยที่ได้จากแต่ละตัวอย่างไปสร้างกราฟระหว่างค่า OD [Optical Density] กับค่าความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้โปรแกรม Excell สร้างกราฟแล้วหาค่าความชัน [m] จากสูตร $Y = mx$ สังเกตค่า R^2 ควรมีค่า 0.99 ขึ้นไป แล้วใช้ m เป็นค่าเทียบมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นหรือปริมาณน้ำตาลในตัวอย่างต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวน

น้ำตาลรีดิวซ์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = $\frac{OD_{520} \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}}$



รูปที่ 1-ข กราฟสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การวัดค่าพีเอช

รูปที่ 2-ข พีเอชมิเตอร์

1. ล้างแท่งแก้วอิเล็กโทรดด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด ใช้กระดาษทิชชูซับให้แห้ง
2. ปรับเครื่องมือให้ได้มาตรฐานตามคำแนะนำในคู่มือด้วยสารละลายบัฟเฟอร์
3. จุ่มแท่งแก้วอิเล็กโทรดลงในสารตัวอย่าง รอจนค่าพีเอชที่ปรากฏบนหน้าจอคงที่

4 . การหาปริมาณโปรตีน

การทำ Stamdart protein โดยวิธี Bradfrot โดยปิเปตสารละลายใส่ใน microcentrifuge ดังนี้

ตารางที่ 2-ข แสดงอัตราส่วนของสารละลายในการเตรียมกราฟมาตรฐานโปรตีน

mg BSA/ml	Stock [BSA] (ไมโครลิตร)	Phosphate buffer pH 7 (ไมโครลิตร)	Biored reagent (ไมโครลิตร)
0	0	800	200
2.5	100	700	200
5	200	600	200
10	400	400	200
15	600	200	200
20	800	0	200

เขย่าและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร และหาปริมาณโปรตีน เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

วิเคราะห์ผลทางสถิติ

1. เปรียบเทียบทางสถิติของประสิทธิภาพเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ III_4 IV_9และ V_7

ANOVA

Value

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.677	2	.338	3E+007	.000
Within Groups	.000	3	.000		
Total	.677	5			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Value

	(I) Isolate	(J) Isolate	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	1.000000	2.000000	.712500000*	********	.000	.71213252	.71286748
		3.000000	.000000000	********	1.000	-.00036748	.00036748
	2.000000	1.000000	-.71250000*	********	.000	-.71286748	-.71213252
		3.000000	-.71250000*	********	.000	-.71286748	-.71213252
	3.000000	1.000000	.000000000	********	1.000	-.00036748	.00036748
		2.000000	.712500000*	********	.000	.71213252	.71286748

*. The mean difference is significant at the .05 level.

2. เปรียบเทียบทางสถิติของประสิทธิภาพเอนไซม์เซลลูเลสจากแลกติกเอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ C_5 และ E_{28}

ANOVA

value

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.036	2	.018	2737352	.000
Within Groups	.000	6	.000		
Total	.036	8			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Multiple Comparisons

Dependent Variable: value

	(I) Isolate	(J) Isolate	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	1	2	-.03010000*	.00006667	.000	-.0302631	-.0299369
		3	.11750000*	.00006667	.000	.1173369	.1176631
	2	1	.03010000*	.00006667	.000	.0299369	.0302631
		3	.14760000*	.00006667	.000	.1474369	.1477631
	3	1	-.11750000*	.00006667	.000	-.1176631	-.1173369
		2	-.14760000*	.00006667	.000	-.1477631	-.1474369

*. The mean difference is significant at the .05 level.

3.เปรียบเทียบทางสถิติของประสิทธิภาพเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ III_4 V_7 และE_{28} ในอาหาร YM ผสม กลูโคส กากสับปะรด และ CMC

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
III4	Between Groups	.027	2	.014	16415.000	.000
	Within Groups	.000	3	.000		
	Total	.027	5			
V7	Between Groups	.044	2	.022	10920.333	.000
	Within Groups	.000	3	.000		
	Total	.044	5			
E28	Between Groups	.002	2	.001	902.104	.000
	Within Groups	.000	3	.000		
	Total	.002	5			

Multiple Comparisons

Dependent Variable		(I) carbon	(J) carbon	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
							Lower Bound	Upper Bound
III4	LSD	1	2	-.12250000*	.00091287	.000	-.1254052	-.1195948
			3	.03500000*	.00091287	.000	.0320948	.0379052
		2	1	.12250000*	.00091287	.000	.1195948	.1254052
			3	.15750000*	.00091287	.000	.1545948	.1604052
		3	1	-.03500000*	.00091287	.000	-.0379052	-.0320948
			2	-.15750000*	.00091287	.000	-.1604052	-.1545948
V7	LSD	1	2	-.18100000*	.00141421	.000	-.1855007	-.1764993
			3	.00000000	.00141421	1.000	-.0045007	.0045007
		2	1	.18100000*	.00141421	.000	.1764993	.1855007
			3	.18100000*	.00141421	.000	.1764993	.1855007
		3	1	.00000000	.00141421	1.000	-.0045007	.0045007
			2	-.18100000*	.00141421	.000	-.1855007	-.1764993
E28	LSD	1	2	-.02505000*	.00092105	.000	-.0279812	-.0221188
			3	.01350000*	.00092105	.001	.0105688	.0164312
		2	1	.02505000*	.00092105	.000	.0221188	.0279812
			3	.03855000*	.00092105	.000	.0356188	.0414812
		3	1	-.01350000*	.00092105	.001	-.0164312	-.0105688
			2	-.03855000*	.00092105	.000	-.0414812	-.0356188

*. The mean difference is significant at the .05 level.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. เปรียบเทียบทางสถิติของประสิทธิภาพเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ III_4 V_7 และE_{28}ที่อุณหภูมิ 30 37 และ 40 องศาเซลเซียส

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
III4	Between Groups	.007	2	.003	1668.000	.000
	Within Groups	.000	3	.000		
	Total	.007	5			
V7	Between Groups	.015	2	.008	5131.444	.000
	Within Groups	.000	3	.000		
	Total	.015	5			

ANOVA

E28

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.001	3	.000	365.980	.000
Within Groups	.000	4	.000		
Total	.001	7			

Multiple Comparisons

Dependent Variable		(I) temp	(J) temp	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
							Lower Bound	Upper Bound
III4	LSD	30	37	-.06000000*	.00141421	.000	-.0645007	-.0554993
			40	.01800000*	.00141421	.001	.0134993	.0225007
		37	30	.06000000*	.00141421	.000	.0554993	.0645007
			40	.07800000*	.00141421	.000	.0734993	.0825007
		40	30	-.01800000*	.00141421	.001	-.0225007	-.0134993
			37	-.07800000*	.00141421	.000	-.0825007	-.0734993
V7	LSD	30	37	-.11550000*	.00122474	.000	-.1193977	-.1116023
			40	-.01850000*	.00122474	.001	-.0223977	-.0146023
		37	30	.11550000*	.00122474	.000	.1116023	.1193977
			40	.09700000*	.00122474	.000	.0931023	.1008977
		40	30	.01850000*	.00122474	.001	.0146023	.0223977
			37	-.09700000*	.00122474	.000	-.1008977	-.0931023

*. The mean difference is significant at the .05 level.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Multiple Comparisons

Dependent Variable: E28

	(I) temp	(J) temp	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	30	37	-.01470000*	00100499	.000	-.0174903	-.0119097
		40	-.00270000	00100499	.055	-.0054903	.0000903
		45	-.02980000*	00100499	.000	-.0325903	-.0270097
	37	30	.01470000*	00100499	.000	.0119097	.0174903
		40	.01200000*	00100499	.000	.0092097	.0147903
		45	-.01510000*	00100499	.000	-.0178903	-.0123097
	40	30	.00270000	00100499	.055	-.0000903	.0054903
		37	-.01200000*	00100499	.000	-.0147903	-.0092097
		45	-.02710000*	00100499	.000	-.0298903	-.0243097
	45	30	.02980000*	00100499	.000	.0270097	.0325903
		37	.01510000*	00100499	.000	.0123097	.0178903
		40	.02710000*	00100499	.000	.0243097	.0298903

*. The mean difference is significant at the .05 level.

5. เปรียบเทียบทางสถิติของประสิทธิภาพเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ III_4 V_7 และE_{28}ที่พีเอช 3 4 5 และ6

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
III4	Between Groups	.017	3	.006	3520.282	.000
	Within Groups	.000	4	.000		
	Total	.017	7			
V7	Between Groups	.052	3	.017	8624.917	.000
	Within Groups	.000	4	.000		
	Total	.052	7			
E28	Between Groups	.001	3	.000	421.736	.000
	Within Groups	.000	4	.000		
	Total	.001	7			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Multiple Comparisons

Dependent Variable		(I) pH	(J) pH	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
							Lower Bound	Upper Bound
III4	LSD	3	4	.07050000*	00127475	.000	.0669607	.0740393
			5	.12050000*	00127475	.000	.1169607	.1240393
			6	.10450000*	00127475	.000	.1009607	.1080393
		4	3	-.07050000*	00127475	.000	-.0740393	-.0669607
			5	.05000000*	00127475	.000	.0464607	.0535393
			6	.03400000*	00127475	.000	.0304607	.0375393
		5	3	-.12050000*	00127475	.000	-.1240393	-.1169607
			4	-.05000000*	00127475	.000	-.0535393	-.0464607
			6	-.01600000*	00127475	.000	-.0195393	-.0124607
		6	3	-.10450000*	00127475	.000	-.1080393	-.1009607
			4	-.03400000*	00127475	.000	-.0375393	-.0304607
			5	.01600000*	00127475	.000	.0124607	.0195393
V7	LSD	3	4	.17600000*	00141421	.000	.1720735	.1799265
			5	.19600000*	00141421	.000	.1920735	.1999265
			6	.18300000*	00141421	.000	.1790735	.1869265
		4	3	-.17600000*	00141421	.000	-.1799265	-.1720735
			5	.02000000*	00141421	.000	.0160735	.0239265
			6	.00700000*	00141421	.008	.0030735	.0109265
		5	3	-.19600000*	00141421	.000	-.1999265	-.1920735
			4	-.02000000*	00141421	.000	-.0239265	-.0160735
			6	-.01300000*	00141421	.001	-.0169265	-.0090735
		6	3	-.18300000*	00141421	.000	-.1869265	-.1790735
			4	-.00700000*	00141421	.008	-.0109265	-.0030735
			5	.01300000*	00141421	.001	.0090735	.0169265
E28	LSD	3	4	.03290000*	00100250	.000	.0301166	.0356834
			5	.02220000*	00100250	.000	.0194166	.0249834
			6	.02820000*	00100250	.000	.0254166	.0309834
		4	3	-.03290000*	00100250	.000	-.0356834	-.0301166
			5	-.01070000*	00100250	.000	-.0134834	-.0079166
			6	-.00470000*	00100250	.009	-.0074834	-.0019166
		5	3	-.02220000*	00100250	.000	-.0249834	-.0194166
			4	.01070000*	00100250	.000	.0079166	.0134834
			6	.00600000*	00100250	.004	.0032166	.0087834
		6	3	-.02820000*	00100250	.000	-.0309834	-.0254166
			4	.00470000*	00100250	.009	.0019166	.0074834
			5	-.00600000*	00100250	.004	-.0087834	-.0032166

*. The mean difference is significant at the .05 level.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.เปรียบเทียบทางสถิติของประสิทธิภาพเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ

ANOVA

value

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	11476.362	6	1912.727	2E+007	.000
Within Groups	.001	14	.000		
Total	11476.364	20			

value

	treat	N	Subset for alpha = .05						
			1	2	3	4	5	6	7
Duncan[a]	3.00	3	53.2800						
	4.00	3		107.5100					
	5.00	3			108.7500				
	1.00	3				112.4800			
	2.00	3					116.1500		
	6.00	3						119.0500	
	7.00	3							133.0300
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้