สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การย่อยสลายเซลลูโลสในใบไม้แห้งโดยเชื้อ *Bacillus* sp. และ *Leifsonia* sp.

The digestion cellulose in dry leaf by *Bacillus* sp. and *Leifsonia* sp.

จัดทำโดย

นางสาวนันท์นภัส	แก้วทิพย์กิจ	รหัส 47040844
นายสรุจน์	วีรวัฒนโยธิน	รหัส 47040855
นางสาวสุพัชชา	ใจอ่อน	รหัส 47040859

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2550

วพ.
ว4 ป17ก
2550

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 85420
วัน,เดือน,ปี 11 พ.ย. 2551

b 12010133
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การย่อยสลายเซลลูโลสในใบไม้แห้งโดยเชื้อ *Bacillus* sp. และ *Leifsonia* sp.

The digestion cellulose in dry leaf by *Bacillus* sp. and *Leifsonia* sp.

จัดทำโดย

นางสาวนันท์นภัส	แก้วทิพย์กิจ	รหัส 47040844
นายสรุจน์	วีรวัฒนโยธิน	รหัส 47040855
นางสาวสุพัชชา	ใจอ่อน	รหัส 47040859

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

....19../...ส.ค../...2551 **อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ**

(อาจารย์อ้อพัชชา จินดาประเสริฐ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นันท์นภัส แก้วทิพย์กิจ, สรุจน์ วีรวัฒนโยธิน และ สุพัชชา ใจอ่อน 2550 การย่อยสลายเซลลูโลสในใบไม้แห้งโดยเชื้อ *Bacillus* sp. และ *Leifsonia* sp. สาขาเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์อพัชชา จินดาประเสริฐ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์

ในการย่อยสลายเซลลูโลสในใบไม้แห้งโดยเชื้อแบคทีเรีย เพื่อทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลสในใบไม้แห้ง นำใบไม้แห้งมาทำการหมักโดยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. strain 8 และ 17 และ *Leifsonia* sp. strain 43 โดยทำการเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) และ Carboxymethyl cellulose (CMC) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง คือ 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ และนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและปริมาณกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลส พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง *Bacillus* sp. *strain* 8 สามารถย่อยสลายเซลลูโลสจากใบไม้แห้งได้ในปริมาณที่สูงที่สุด ให้ปริมาณกลูโคส 867.311 $\mu g / ml$ ในชั่วโมงที่ 24 ที่ใบไม้ 60 กรัม รองลงมาคือเชื้อ *Leifsonia sp. strain* 43 ให้ปริมาณกลูโคส 584.171 $\mu g / ml$ ในชั่วโมงที่ 48 ที่ใบไม้ 60 กรัม และ *Bacillus* sp. *strain* 17 ให้ปริมาณกลูโคส 132.062 $\mu g / ml$ ในชั่วโมงที่ 24 ที่ใบไม้ 60 กรัม ตามลำดับ แหล่งอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อพบว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว CMC มีความเหมาะสมมากกว่าอาหารเหลว จากการย่อยสลายเซลลูโลสโดยไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียพบมีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายเซลลูโลสเกิดขึ้นในปริมาณที่น้อยกว่าการใส่เชื้อแบคทีเรีย

สุพัชชา ใจอ่อน	.....	
นันท์นภัส แก้วทิพย์กิจ	(ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา)	
.....	.....	16 มีค. 2550
(ลายมือชื่อนักศึกษา)	(ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม)	วัน เดือน ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณอาจารย์อพัชชา จินดาประเสริฐ และรศ.ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำและความรู้ต่างๆ ตลอดจนการตรวจทานและแก้ไขปัญหาพิเศษฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอขอบคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่ น้อง สมาชิกในครอบครัวที่ให้การสนับสนุนมาโดยตลอดในทุกด้านโดยเฉพาะทางด้านกำลังทรัพย์และกำลังใจข้อคิดต่างๆ จนทำให้การทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณเพื่อนทุกคนที่ช่วยเป็นทั้งกำลังกายและกำลังใจ และขอขอบคุณทุกความช่วยเหลือในการทำให้ปัญหาพิเศษครั้งนี้

นันท์นภัส แก้วทิพย์กิจ
สรุจน์ วีรวัฒนโยธิน
สุพัชชา ใจอ่อน

มีนาคม 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ.....ก
กิตติกรรมประกาศ.....ข
สารบัญ.....ค
สารบัญตาราง.....จ
สารบัญภาพ.....ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร.....2
2.1 บาซิลลัส ซีเรียส (*Bacillus cereus*).....2
2.2 การย่อยสลายเซลลูโลส.....4
2.3 วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร.....7
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....11
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....13
3.1 เชื้อจุลินทรีย์.....13
3.2 แหล่งคาร์บอน.....13
3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ.....13
3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....15
3.5 สารเคมี.....15
3.6 วิธีการทดลอง.....15
3.7 การวิเคราะห์.....17
3.8 สถานที่ทำการทดลอง.....17
3.9 ระยะเวลาที่ทำการทดลอง.....18
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....19
4.1 ผลการทดลองการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ *Bacillus* sp. strain 8.....19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2 ผลการทดลองการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ *Bacillus* sp. strain 17.....22
4.3 ผลการทดลองการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ *Leifsonia* sp. strain 43.....25
4.4 ผลการทดลองการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยไม่ใส่เชื้อ.....28
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....31
เอกสารอ้างอิง.....32
ประวัติผู้เขียน.....56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 แสดงรายละเอียดพื้นที่ปลูกผลผลิตพืชหลัก และไม้ยางพารา
ปี 2543/2544 และ 2544/254.....9
2.2 ตารางที่ 2.2 แสดงศักยภาพชีวมวลของประเทศไทยปี 2544/2545.....10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 บาซิลลัส ซีเรียส (*Bacillus cereus*)..... 2

2.2 โครงสร้างของเซลลูโลส.....5

2.3 โครงสร้างของผนังเซลพืชทั้งไม้เนื้ออ่อนและไม้เนื้อแข็ง.....7

3.1 ใบไม้แห้งก่อนทำการทดลอง.....13

3.2 การย่อยสลายเซลลูโลสในใบไม้แห้งโดยไม่ใส่เชื้อ ในอาหารเหลว NB.....17

4.1 ผลปริมาณกลูโคส ($\mu g / ml$) จากการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ *Bacillus* sp. strain 8 ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ NB เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....20

4.2 ผลค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ *Bacillus* sp. strain 8 ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ NB เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....20

4.3 ผลปริมาณกลูโคส ($\mu g / ml$) จากการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ *Bacillus* sp. strain 8 ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ CMC เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....21

4.4 ผลค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ *Bacillus* sp. strain 17 ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ CMC เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....21

4.5 ผลปริมาณกลูโคส ($\mu g / ml$) จากการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ *Bacillus* sp. strain 17 ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ NB เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....23

4.6 ผลค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ *Bacillus* sp. strain 17 ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ NB เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....23

4.7 ผลปริมาณกลูโคส ($\mu g / ml$) จากการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ *Bacillus* sp. strain 17 ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ CMC เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....24

4.8 ผลค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ *Bacillus* sp. strain 17 ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ CMC เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

4.9 ผลปริมาณกลูโคส ($\mu g / ml$) จากการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ
Leifsonia sp. strain 43 ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ NB เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....26
4.10 ผลค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ
Leifsonia sp. strain 43 ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ NB เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....26
4.11 ผลปริมาณกลูโคส ($\mu g / ml$) จากการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ
Leifsonia sp. strain 43 ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ CMC เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....27
4.12 ผลค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ
Leifsonia sp. strain 43 ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ CMC เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....27
4.13 ผลปริมาณกลูโคส ($\mu g / ml$) จากการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ
ไม่ใส่เชื้อในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ NB เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....29
4.14 ผลค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ
ไม่ใส่เชื้อในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ NB เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....29
4.15 ผลปริมาณกลูโคส ($\mu g / ml$) จากการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ
ไม่ใส่เชื้อในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ CMC เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....30
4.16 ผลค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ
ไม่ใส่เชื้อในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ CMC เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
คำนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม และในปัจจุบันได้มีอุตสาหกรรมทางการเกษตรและการแปรรูปเกิดเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้มีวัสดุเหลือทิ้งเป็นจำนวนมากด้วยเช่นกัน เช่น ใบไม้ กิ่งไม้ เปลือกผลไม้ เมล็ด รวมไปถึงผลผลิตที่เน่าเสีย ดังนั้นเพื่อเป็นการจัดการวัสดุเหลือทิ้งจึงมีการใช้เอนไซม์หลายชนิดในการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและอุตสาหกรรมต่างๆ โดยวัสดุเหลือทิ้งส่วนมากจะมีโครงสร้างของเซลลูโลส ซึ่งจะประกอบไปด้วยน้ำตาลกลูโคส และ น้ำตาลไซโลส (xylose) ซึ่งในกระบวนการย่อยเซลลูโลสจากวัสดุเหลือทิ้งจะสามารถเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือทิ้งและสามารถนำผลิตผลที่ได้จากการผลิตในส่วนของน้ำตาล นำมาเป็นแหล่งพลังงานทดแทนน้ำมันได้เช่น ethanol และ biogases เป็นต้น

ในปัญหาพิเศษนี้เป็นการศึกษาชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสจากใบไม้แห้งได้ดีที่สุด

วัตถุประสงค์การทดลอง

1. ทดสอบการย่อยสลายเซลลูโลสจากใบไม้แห้งโดยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. strain 8 และ 17 และ *Leifsonia* sp. strain 43 ในระดับห้องปฏิบัติการ

2. เพื่อหาแหล่งอาหารที่เหมาะสมของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. strain 8 และ 17 และ *Leifsonia* sp. strain 43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

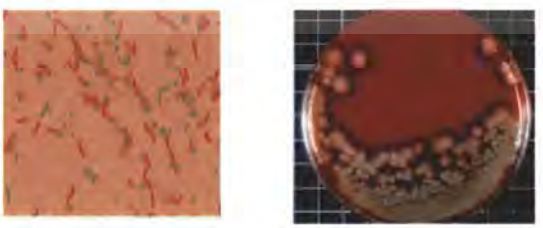
บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

2.1 บาซิลลัส ซีเรียส (*Bacillus cereus*)

(แผนกวิเคราะห์ข้อมูล ฝ่ายบริการข้อมูลและสารสนเทศ สถาบันอาหาร)

Bacillus cereus and other *Bacillus* spp. *Bacillus cereus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สามารถสร้างสปอร์ได้ทั้งในที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนเซลล์ของมันเป็นแท่งขนาดใหญ่ และ sporangium ในสปอร์ของมันจะไม่บวม ลักษณะพิเศษเหล่านี้และอื่น ๆรวมถึงลักษณะสำคัญทางชีวเคมี ซึ่งใช้บอกความแตกต่างและยืนยันลักษณะเฉพาะของ *B. cereus* แม้ว่าลักษณะลักษณะพิเศษนี้จะมีอยู่ใน *B. cereus var. mycoides* , *B. thuringiensis* และ *B. anthracis*

การแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตชนิดนี้อาศัยการวิเคราะห์การเคลื่อนไหว (*B. cereus* ส่วนใหญ่จะเคลื่อนไหวได้) การมี toxin crystals ของ *B. thuringiensis* การกระตุ้นการแตกของเม็ดเลือดซึ่งใน *B. cereus* และตัวอื่น ๆ จะเป็นเบตาฮีโมลีติก ส่วน *B. anthracis*ปกติแล้วจะไม่ทำให้เม็ดเลือดแตก และการงอกของไรซอยด์เป็นลักษณะพิเศษของ *B. cereus* var. *mycoides* บาซิลลัส ซีเรียส เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นรูปท่อนตรง ขนาด 0.3-2.2 x 1.2-7.0 ไมโครเมตร ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ สร้างสปอร์ และสร้างสารพิษ ซึ่งจะขับสารพิษออกมาขณะปนเปื้อนอยู่ในอาหาร ช่วงอุณหภูมิในการเติบโตอยู่ระหว่าง 30-37 องศาเซลเซียส แต่บางสายพันธุ์สามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 55 องศาเซลเซียส และบางสายพันธุ์เติบโตได้ที่อุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส สำหรับค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อชนิดนี้อยู่ระหว่าง 6-7 และสามารถเติบโตได้ดีในสภาพที่มีออกซิเจน และจะสร้างสารพิษเมื่ออยู่ภายใต้สภาพที่มีออกซิเจนน้อย (ภาพที่ 2.1)



ภาพที่ 2.1 บาซิลลัส ซีเรียส (Bacillus Cereus)

(ที่มา : http://www.techno.msu.ac.th/fn/ecenter/pathogens/bacillus_cereus_and_other_bacill.htm)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหล่งที่มาของเชื้อ บาซิลลัส ซีเรียส (ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์,2543)

เชื้อ บาซิลลัส ซีเรียส พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ในดิน ฝุ่นละออง ผลิตภัณฑ์จากพืช เช่น ข้าว ธัญพืช แป้ง ผลิตภัณฑ์จากแป้ง เครื่องเทศ ผลิตภัณฑ์จากสัตว์ และเครื่องปรุงแต่งรสต่างๆ นอกจากนี้ยังพบในอุจจาระของคนที่มีสุขภาพปกติได้ประมาณ 15% อาหารที่พบว่าทีการปนเปื้อนของเชื้อ บาซิลลัส ซีเรียส จนทำให้เกิดอาการอาเจียนได้แก่ อาหารประเภทข้าว และแป้ง อาทิ มักกะโรนี และข้าวผัด เนยแข็ง ผลิตภัณฑ์จากวานิลลาที่ทำในลักษณะยัดไส้ครีม ส่วนอาหารที่พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อจนทำให้เกิดอาการท้องร่วง ได้แก่ ผักต่างๆ สลัด อาหารที่มีเนื้อสัตว์เป็นส่วนประกอบ ซอส ซุป และอาหารที่มีแป้งและครีมเป็นส่วนประกอบ

การวินิจฉัยโรคของมนุษย์ (ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์,2543)

มีการยืนยันว่า *B. cereus* เป็นตัว etiologic ใน foodborne การระบาดของโรคต้องมีการตรวจสอบ

(1) การแยกเชื้อสายพันธุ์ที่เป็น serotype เหมือนกัน จากอาหารที่สงสัย รวมถึงอุจจาระและอาเจียนของผู้ป่วย

(2) การแยก *B. cereus* จำนวนมากที่ทราบว่าเป็น serotype ซึ่งทำให้เกิด foodborne illness จากอาหารที่สงสัย รวมถึงอุจจาระและอาเจียนของผู้ป่วย หรือ

(3) การแยก *B. cereus* จากอาหารที่สงสัยและวิเคราะห์ enterotoxigenicity ของเชื้อ โดยการทดสอบทาง serological (พิษที่ทำให้ท้องร่วง) หรือทางชีวเคมี (ท้องร่วงหรืออาเจียน) โรคที่มีการอาเจียนจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วซึ่งเกิดขึ้นเมื่อทานอาหารบางชนิด ซึ่งบ่อยครั้งก็พอเพียงที่จะวินิจฉัยโรคว่าเป็นชนิดของอาหารเป็นพิษ

การเข้าสู่ร่างกาย (ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์, 2543)

บาซิลลัส ซีเรียส เป็นแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเป็นพิษ และสามารถถ่ายทอดเข้าสู่ร่างกายได้โดยการรับประทานอาหารที่มีเชื้อนี้ปนเปื้อน อาหารที่พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อ บาซิลลัส ซีเรียส จนทำให้เกิดอาการอาเจียนได้แก่ อาหารประเภทข้าว และแป้ง อาทิ มักกะโรนี และข้าวผัด เนยแข็ง ผลิตภัณฑ์จากวานิลลาที่ทำในลักษณะยัดไส้ครีม ส่วนอาหารที่พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อจนทำให้เกิดอาการท้องร่วง ได้แก่ ผักต่างๆ สลัด อาหารที่มีเนื้อสัตว์เป็นส่วนประกอบ ซอส ซุป และอาหารที่มีแป้งและครีมเป็นส่วนประกอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อันตรายของเชื้อ บาซิลลัส ซีเรียส (ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์, 2543)

บาซิลลัส ซีเรียส เป็นแบคทีเรียที่สร้างสารพิษ การเกิดพิษมี 2 ลักษณะอาการคือ ทำให้อาเจียน (Emetic illness) และทำให้ท้องเสีย (Diarrhea illness) อาการอาเจียนมักเกิดจากการได้รับสารพิษชนิดที่มีความคงทน ที่สามารถมีชีวิตรอดได้ในอุณหภูมิสูงและค่าความเป็นกรด-ด่างสูง โดยผู้ป่วยจะเกิดอาการคลื่นไส้และอาเจียน ภายหลังจากการบริโภคอาหารที่มีสารพิษเข้าไป 11-15 ชั่วโมง แต่โดยทั่วไปมักปรากฏอาการภายหลังจากการบริโภคอาหารที่มีสารพิษเข้าไป 30 นาทีถึง 6 ชั่วโมงส่วนอาการท้องเสียมักเกิดจากสารพิษชนิดที่ไม่ทนความร้อนและกรด ตามปกติใช้เวลาฟักตัวประมาณ 6-12 ชั่วโมง หลังจากบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนสารพิษของเชื้ออาการประกอบด้วย การปวดท้องและถ่ายอุจจาระเหลว เนื่องจากมีน้ำมาก โดยทั่วไปอาการจะทรงอยู่ไม่เกิน 24 ชั่วโมง แล้วก็จะทุเลาลง

วิธีป้องกัน (ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์, 2543)

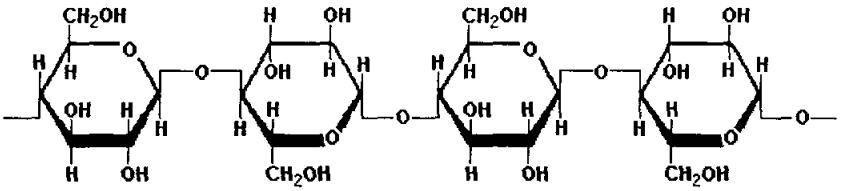
บลาซิลลัส ซีเรียส เป็นเชื้อชนิดที่ก่อปัญหากับอุตสาหกรรมการจัดบริการอาหาร ที่ต้องมีการเตรียมอาหารจำนวนมาก หรือต้องจัดเตรียมอาหารขึ้นล่วงหน้าเป็นเวลานานๆ ก่อนนำไปบริโภค เพราะหากในระหว่างการปรุง และการเก็บรักษามีการปฏิบัติที่ไม่ถูกสุขลักษณะหรือไม่สะอาด จะทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อชนิดนี้ขึ้น ซึ่งกว่าที่จะนำอาหารไปบริโภคเชื้อชนิดนี้อาจเพิ่มจำนวนในอาหารมากขึ้นเรื่อยๆ ได้ ดังนั้น ในขั้นตอนของการจัดเตรียม การเก็บรักษา และการขนส่งอาหาร จึงต้องกระทำอย่างระมัดระวัง และรักษาความสะอาด โดยเฉพาะอาหารที่ทำให้สุกแล้ว ไม่ควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนานเกินควร

2.2 การย่อยสลายเซลลูโลส

เซลลูโลสเป็นสารประกอบพวกโพลีแซคคาไรด์ชนิดหนึ่งที่มีมากในผนังเซลของพืช โครงสร้างของโมเลกุลเป็นแบบไม่มีกิ่งก้านสาขาประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสหลายๆ หน่วยมาต่อกันเป็นเส้นยาวด้วยพันธะแบบ β(1-4)-glycosidic bond (ภาพที่ 2.2) เซลลูโลสจะไม่ละลายด้วยน้ำ ตัวทำละลายอินทรีย์ หรือสารละลายด่างอ่อน แต่จะละลายในกรดและด่างแก่ เมื่อย่อยสลายโดยสมบูรณ์ด้วยกรดหรือเอนไซม์จะได้น้ำตาลกลูโคสอย่างเดียว แต่ถ้าการย่อยสลายตัว ไม่สมบูรณ์จะได้เซลโลไบโอส (Cellobiose) ซึ่งเป็นไดแซคคาไรด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Disaccharide) และได้โอลิโกแซคคาไรด์ (Oligosaccharide) อื่นๆ (http://www.sut.ac.th/e-texts/Agri/Ruminant%20Nutrition/unit%205.1.htm)



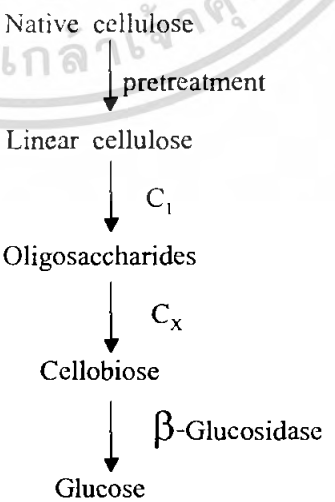
ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของเซลลูโลส

(ที่มา : http://www.elib-online.com/doctors/food_enzyme01.html)

เอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสจะเรียกว่าเซลลูเลส พบว่าเอ็นไซม์เซลลูเลสเป็นเอ็นไซม์เชิงซ้อน (Complexenzyme)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) ขั้นตอนการย่อยสลายเซลลูโลสแสดงดังนี้

(http://www.sut.ac.th/e-texts/Agri/Ruminant%20Nutrition/unit%205.1.htm)

- Endoglucanases (C_x) จะย่อยสลายเซลลูโลสไปเป็นกลูโคส เซลโลไบโอส โอลิโกแซคคาไรด์ โดยจะย่อยสลายด้านในของสายเซลลูโลสแบบสุ่ม
- Exoglucanases (C_1) จะย่อยสลายเซลลูโลสและโอลิโกแซคคาไรด์ไปเป็นเซลโลไบโอส โดยจะย่อยสลายด้านปลายของสายเซลลูโลส
- β-Glucosidases จะย่อยสลายเซลโลไบโอสไปเป็นกลูโคส



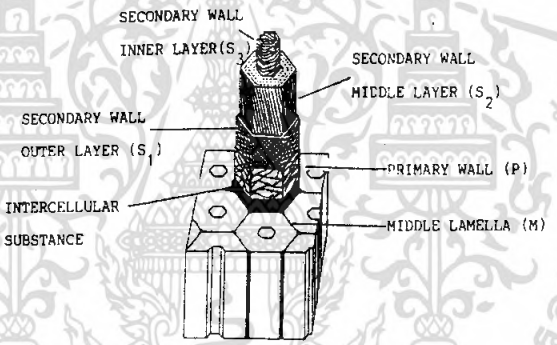
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลลูโลส (Cellulose) เป็นคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ ประกอบด้วยโมเลกุลที่ต่อกันเป็นโซ่ยาวของกลูโคส พบมากในพืช เพื่อทำหน้าที่เสริมโครงสร้างของลำต้นและกิ่งก้านของพืช ผักและผลไม้ให้แข็งแรง เป็นส่วนประกอบหลักของผนังเซลล์ พืช และพบว่าสาร organic carbon ในโลกนี้มากกว่าครึ่งหนึ่ง เป็น เซลลูโลส โครงสร้างประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคสหลายโมเลกุล ที่จัดเป็นเส้นยาวตรงเชื่อมต่อกับด้วย beta (1->4) glycosidic bonds ซึ่งสัตว์มีกระดูกสันหลังไม่มีเอนไซม์ที่จะย่อยได้ พวกสัตว์กินพืชกินเซลลูโลสเข้าไปมากแต่ไม่ได้ย่อยได้ด้วยกระบวนการย่อยของตนเองแต่เป็นเพราะมีพวกสิ่งมีชีวิตเล็กๆ พวกจุลชีพ (microbes) อยู่ที่ทางเดินอาหารที่สร้างเซลลูเลส สามารถย่อยสลายเซลลูโลส ได้ ร่างกายคนเราไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้แต่จะมีการขับถ่ายออกมาในลักษณะของกากเรียกว่า เส้นใยอาหาร ช่วยกระตุ้นให้ลำไส้ใหญ่ทำงานอย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น ทำให้ขับถ่ายสะดวก พืชประเภทผัก และถั่ว ผลไม้ จัดเป็นแหล่งที่ให้เส้นใยอาหาร เพราะมีเซลลูโลสอยู่ปริมาณสูง ดังนั้นจึงควรกินเป็นประจำทุกวัน เซลลูโลสเมื่อย่อยจะแตกตัวออกให้น้ำตาลกลูโคส สัตว์ที่กินหญ้าจะสามารถย่อยเซลลูโลสได้โดยอาศัยแบคทีเรียในกระเพาะอาหารเป็นตัวย่อย เมื่อย่อยแล้วจะได้น้ำตาลกลูโคส แต่ถ้าสลายไม่สมบูรณ์ จะได้เป็นน้ำตาลเซลโลไบโอส เซลลูโลสเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ เพราะมีโมเลกุลใหญ่มาก ประกอบด้วยกลูโคสประมาณ 1,250-12,500 โมเลกุลพบมากที่สุดในพืช เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พืช ในพืชผักผลไม้ทำหน้าที่เป็น โครงสร้างที่ช่วยเพิ่มความแข็งแรงให้กับเนื้อเยื่อของพืช มีมากตามใบผัก ก้านผัก และเปลือกนอกของผลไม้ เมื่อรับประทานเข้าไปแล้วร่างกายไม่สามารถย่อยสลายได้ แต่การรับประทานเซลลูโลสเป็นประโยชน์ คือ ช่วยในการขับถ่ายได้โดยทำให้เป็นกากอาหารในลำไส้ทำหน้าที่ กระตุ้นให้ลำไส้ใหญ่เกิดการขับถ่ายกากอาหารที่ไม่ย่อยและป้องกันท้องผูก เซลลูโลสเมื่อถูกย่อยจะแตกตัวออก ให้น้ำตาลกลูโคสจำนวนมาก เป็นคาร์โบไฮเดรตที่ไม่มีรสหวานมีโมเลกุลขนาดใหญ่และมีสูตรโครงสร้างซับซ้อน มีสูตร $(C_6H_{10}O_5)n$ ประกอบด้วยโมเลกุลของโมโนแซ็กคาไรด์ จำนวนมากมาย หลายพันโมเลกุล (http://www.sut.ac.th/e-texts/Agri/Ruminant%20Nutrition/unit%205.1.htm)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

พืชและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่างๆจะมีเฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose), เซลลูโลส (Cellulose) และ Pectic substances เป็นองค์ประกอบอยู่มาก สารประกอบพวกเฮมิเซลลูโลส, เซลลูโลส และ Pectic substances เป็นโพลีแซคคาไรด์ที่พบมากในผนังเซลล์ (Cell wall) ของพืช ขณะที่พืชยังมีชีวิตและอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์จะไม่ถูกทำลายโดยจุลินทรีย์ต่างๆเนื่องจากมีสารที่ยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ แต่หลังจากที่พืชตายหรือมีบาดแผลเกิดขึ้น สารยับยั้งจะถูกทำลาย โครงสร้างของพืชก็จะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นโดยจุลินทรีย์ โครงสร้างของผนังเซลล์พืชทั้งไม้เนื้ออ่อน (Soft wood) และไม้เนื้อแข็ง (Hard wood) จะแบ่งออกเป็นชั้น ๆ (ภาพที่ 2.3) ดังนี้คือ



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างของผนังเซลพืชทั้งไม้เนื้ออ่อนและไม้เนื้อแข็ง
(ที่มา : เทคโนโลยีชีวภาพ พัฒนาผลผลิตทางการเกษตร, 2547)

- ชั้น Primary wall (P) จะหนาประมาณ 0.1–0.2 μm ซึ่งประกอบด้วย Cellulose microfibril ที่มีการจัดเรียงตัวกันแบบสุ่ม (Random) และถูกห่อหุ้มไว้ด้วยร่างแหของ เฮมิเซลลูโลส และ Pectic substances

- ชั้น Secondary wall (S) จะพบเฮมิเซลลูโลสกระจายอยู่ทั่วไป ชั้น S จะแบ่งย่อยออกเป็นชั้น S_1, S_2, และ S_3 ชั้น S_1 หนาประมาณ 0.1– 0.3 μm มีลักษณะเป็น Cellulose microfibril ที่มีการจัดเรียงตัวกันแบบ Cross hatch ในชั้น S_2 จะหนาประมาณ 1–5 μm ชั้นนี้เป็นชั้นที่ใหญ่ที่สุดในผนังเซลของพืชและการเรียงตัวของ Cellulose microfibril จะเป็นระเบียบแบบเส้นขนาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Parallel) ส่วนชั้น S_3 จะหนาประมาณ 0.1 μm การจัดเรียงตัวของ Cellulose microfibril ในชั้นนี้เป็นแบบ Flat helix และพบลิกนินบ้างเล็กน้อย

- ชั้น Middle lamella (M) จะเป็นชั้นที่เชื่อมต่อกันระหว่างเซลของผนังเซลพืชที่อยู่ติดกัน ชั้นนี้ ส่วนใหญ่จะประกอบด้วยลิกนินและ Pectic substances

2.3.1ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (http://www.dede.go.th/dede/index.php?id=437)

ประเทศไทยนับเป็นประเทศเกษตรกรรมที่สำคัญแห่งหนึ่งของโลก ประชาชนมากกว่าร้อยละ 50 ประกอบอาชีพเกษตรกรรม ผลพลอยได้ที่สำคัญนอกเหนือจากผลผลิตการเกษตรก็คือวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว แกลบ กากอ้อย กาก ใย และทะลายปาล์ม เป็นต้น

ชีวมวล (Biomass) หมายถึง วัสดุหรือสารอินทรีย์ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นพลังงานได้ ชีวมวลนับรวมถึงวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เศษไม้ ปลายไม้จากอุตสาหกรรมไม้ มูลสัตว์ ของเสียจากโรงงานแปรรูปทางการเกษตร และของเสียจากชุมชน

ปริมาณชีวมวลจากเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ที่ผลิตภายในประเทศจะแปรผันและขึ้นอยู่กับปริมาณผลผลิตทางการเกษตรของประเทศดังแสดงในตารางที่ 2.1 และ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 แสดงรายละเอียดพื้นที่ปลูก ผลผลิตพืชหลัก และไม้ยางพารา ปี 2543/2544 และ 2544/2545 (หน่วย: พันไร่ / พันตัน)

	2543/44		2544/45	
ชนิด	พื้นที่เก็บเกี่ยว	ผลผลิต	พื้นที่เก็บเกี่ยว	ผลผลิต
อ้อย	5,421	49,070	6,320	60,013
ข้าว	65,640	25,608	63,283	26,514
น้ำมันปาล์ม	1,303	3,256	1,456	4,089
ข้าวโพด	7,551	4,397	7,474	4,466
มันสำปะหลัง	7,068	19,064	6,176	16,868
สับปะรด	608	2,287	552	1,987
ไม้ยางพารา	11,558	2,378	11,590	2,424

ที่มา: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร 2544/45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 แสดงศักยภาพชีวมวลของประเทศไทยปี 2544/2545

ชนิด	ผลผลิต (10^6kg)	วัสดุเหลือใช้	ปริมาณวัสดุเหลือใช้ (10^6kg)	ค่าความร้อน (MJ/kg)	พลังงาน (TJ)	เทียบเท่าน้ำมันดิบ (MT)	กำลังไฟฟ้า (MW)
อ้อย	60013.00	ชานอ้อย	3,615.00	14.40	52,056.04	1.23	764.21
		ยอดและใบ	17,870.19	17.39	310,762.62	7.36	4,105.92
ข้าว	26514.00	แกลบ	3,006.42	14.27	42,901.65	1.02	566.83
		ฟางข้าว	8,106.60	10.24	83,011.61	1.97	1,096.78
น้ำมันปาล์ม	4089.00	ทะลายปาล์ม	1,022.05	17.86	18,253.88	0.43	241.18
		เส้นใย	80.55	17.62	1,419.21	0.03	18.75
		กะลา	7.41	18.46	136.85	0.00	1.81
		ก้านทาง	10,647.76	9.83	104,667.44	2.48	1,382.91
		ทะลายตัวผู้	952.74	16.33	15,558.20	0.37	205.56
มะพร้าว	1396.00	เปลือก	300.68	16.23	4,880.11	0.12	64.48
		กะลา	84.43	17.93	1,513.83	0.04	20.00
		ทะลาย	57.66	15.40	888.03	0.02	11.73
		ทาง	254.11	16.00	4,065.71	0.10	53.72
มันสำปะหลัง	16868.00	ต้น	604.14	18.42	11,128.34	0.26	147.03
ข้าวโพด	4466.00	ซัง	816.88	18.04	14,736.44	0.35	194.71
ถั่วลิสง	129.00	เปลือก	41.67	12.66	527.50	0.01	6.97
ฝ้าย	36.00	ลำต้น	116.35	14.49	1,685.94	0.04	22.27
ถั่วเหลือง	292.00	ลำต้นและใบ	590.97	19.44	11,488.51	0.27	151.79
ข้าวฟ่าง	145.00	ใบและต้น	117.64	19.23	2,262.18	0.05	45.14
เศษไม้	10268.00	กิ่งก้าน	2,669.68	14.98	39,991.81	0.95	528.39
รวมวัสดุเหลือใช้			48,293.26				
รวมพลังงานทั้งหมด					721,935.91	17.10	9,630.18

ที่มา : กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน (พพ.)กระทรวงพลังงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

นางสาวจิตราวดี สมศรี และ นางสาวศุภพร อินทร์พรหม (2550) ได้ทำการศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ โดยการนำแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ O_2, B1, B8, B12, B17 และ B43 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากแหล่งธรรมชาติและสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสด้ปริมาณสูงมาเลี้ยงในอาหาร production medium เพื่อผลิต crude enzyme ที่ได้ไปทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส โดยแหล่งไนโตรเจนที่ใช้คือ Yeasr extract, Peptone และ Ammonium sulfate ซึ่งเชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์มีกิจกรรมเอนไซม์สูงในแหล่งไนโตรเจน Ammonium sulfate พบว่าเชื้อที่ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดคือ B8 ให้กิจกรรมเอนไซม์ 1,250.55 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ Ammonium sulfate 0.5 กรัมต่อลิตร และ B17 ให้กิจกรรมเอนไซม์ 1,206.11 หน่วยต่อลิตร ดังนั้นแบคทีเรียสายพันธุ์ B8 และ B17 จึงเป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ปริมาณสูง

นางสาวธันยธรณ์ ปิยชัยเศรษฐ์ และ นายเอกรัตน์ อุ่นบางตลาด (2549)ได้ทำการศึกษาการคัดเลือกจุลินทรีย์จากแหล่งธรรมชาติเพื่อใช้ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส และเซลลูเลส นำเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและเซลลูเลสไปส่องกล้องจุลทรรศน์พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มเดียวกัน จึงคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียมา 5 isolates คือเชื้อแบคทีเรียหมายเลข B6, B7, B12, B17 และ B43 ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียรหัส B17 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดที่ค่าเท่ากับ 0.92 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนในการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อยสลายเซลลูโลสจะเลี้ยงในอาหารเหลว CMC จากนั้นนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียรหัส B17 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดที่ค่าเท่ากับ 14.58 หน่วยต่อมิลลิลิตร

นางสาวสุฤทัย ล้ำประเสริฐ (2544) ทำการศึกษาการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส จากกระเพาะส่วนต้นของวัวและมูลวัว สามารถสรุปได้ดังนี้ จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส พบว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 45 และ 50 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูง โดยพบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองเป็นเชื้อที่ได้จากตัวอย่างมูลวัว และจาสกการใช้วัตถุดิบธรรมชาติเป็นแหล่งคาร์บอน ใน 3 สภาวะ ปรากฏว่าสภาวะที่ทำการ pretreat หญ้าขนและมีสารอาหารเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วยจะผลิตเอนไซม์ที่ให้ค่า CMCase มากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รองลงมาคือ หญ้าขนที่ผ่านการ pretreat แต่ไม่มีสารอาหารอื่นเป็นองค์ประกอบ ส่วนหญ้าขนที่ไม่ผ่านการ pretreat จะผลิตเอนไซม์ที่ให้ค่า CMCase ต่ำที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

3.1.1. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. strain 8 และ 17

3.1.2. เชื้อแบคทีเรีย *Leifsonia* sp. strain 43

3.2 แหล่งคาร์บอน

ใบไม้แห้งชนิดต่างๆประกอบด้วยใบขนุนแห้งร้อยละ 80 และใบไม้แห้งชนิดต่างๆร้อยละ 20 แหล่งที่เก็บใบไม้บริเวณชุมนุมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ซึ่งเก็บใบไม้ไว้ในถุงดำไม่มัดถุง ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปทำการทดลอง ดังรูป 3.2

ภาพที่ 3.1 ใบไม้แห้งก่อนทำการทดลอง

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.3.1. ขวดรูปชมพูขนาด 1,000 มิลลิลิตร

3.3.2. ขวดปรับปริมาตร 100 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.3.3. ปิเปตขนาด 1 , 5 และ 10 มิลลิลิตร

3.3.4. บีกเกอร์ขนาด 150 , 250 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.3.5. หลอดทดลองขนาด 16 × 150 มิลลิเมตร

3.3.6. ที่วางหลอดทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.7. กระบอกตวงขนาด 100 , 250 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.3.8. ลูปเขี่ยเชื้อ

3.3.9. ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.3.10. หม้อสแตนเลส

3.3.11. ที่คน (Spreader)

3.3.12. เตาแก๊ส

3.3.13. ลูกแก้ว

3.3.14. ขวดสีชา

3.3.15. สำลี

3.3.16. กระดาษทิชชู

3.3.17. ช้อนตักสาร

3.3.18. แท่งแก้ว

3.3.19. ถิ่วเวทพลาสติก

3.3.20. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ของบริษัท Back man corporation รุ่น Allegra X- 12R ประเทศ USA.

3.3.21. เครื่อง vortex mixer รุ่น Scientific Industies ประเทศ USA

3.3.22. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrometer) รุ่น Spectro 22 ประเทศ USA

3.3.23. เครื่องตู้เขี่ยเชื้อ (Biohazard Larminar Flow) รุ่น HVB 120 S BOSS Tech

3.3.24. เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง ของ Adventurer Ohaus ประเทศ USA

3.3.25. เครื่องเขย่า (Shaker) ของ Platform shaker รุ่น innova2100 New Jersey, USA

3.3.26. อ่างควบคุมอุณหภูมิของ memmert ประเทศ Germany

3.3.27. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อแบบไอน้ำ (Autoclave) ของ Tomy ประเทศ USA

3.3.28. ตู้แช่เย็นมิราจ รุ่น BC-250 ผลิตโดยบริษัท พรีเมียร์มาร์เก็ตติ้ง ประเทศไทย

3.3.29. ขวดบ่มใบไม้พลาสติกใสขุ่นทนร้อนความจุ 1800 ลูกบาศก์เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 4 นิ้ว สูง 9.5 นิ้ว ผลิตที่ประเทศ อิตาลี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.4.1. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) (ภาคผนวก ก)

3.4.2. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) (ภาคผนวก ก)

3.3.3. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Carboxymethyl cellulose (CMC) (ภาคผนวก ก)

3.5 สารเคมี

3.5.1. Cupper(II)sulfate ($CuSo_4.5H_2O$)

3.5.2. Sodium dihydrogen phosphate (Na_2HPO_2)

3.5.3. Sodium Potassium Tartate ($KNaC_4H_4O_6.4H_2O$)

3.5.4. Sodium hydrokide (NaOH)

3.5.5. Sodium sulphate anhydrous (Na_2SO_4)

3.5.6. Ammonium molybdate [$(NH_4)6Mo_7O_{24}.4H_2O$]

3.5.7. Sulfuric acid (H_2SO_4)

3.5.8. Disodium Arsenate ($Na_2HaSO_4.7H_2O$)

3.5.9. Tris HCl buffer

3.5.10. Ammonium dihydrogen phosphate ($NH_4H_2PO_4$)

3.5.11. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)

3.5.12. di-potassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)

3.5.13. Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4.7H_2O$)

3.5.14. alcohol ร้อยละ70

3.5.15. alcohol ร้อยละ95 จากองค์การจุฬา ฉะเชิงเทรา

3.6 วิธีการทดลอง

3.6.1 การเตรียมหัวเชื้อ

เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. และ *Leifsonia* sp. โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient broth (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.6.2 การเตรียมตัวอย่างใบไม้แห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เก็บใบไม้แห้งชนิดต่างๆ ซึ่งประกอบด้วยใบขนุนแห้งร้อยละ80 และ ใบไม้แห้งชนิดต่างๆร้อยละ 20 นำมาฉีกให้ละเอียดเป็นชิ้นเล็กประมาณ 1-3 เซนติเมตร

3.6.3 การศึกษาการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp.

1. นำหัวเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. จากข้อ 3.6.1 มาดูดใส่ลงในอาหารเหลว NB และ CMC ปริมาตร 500 มิลลิลิตร อย่างละ 25 มิลลิลิตร

2. ใส่ลงในขวดบ่มที่มีใบไม้แห้งที่ 20, 40 และ 60 กรัม โดยกดให้ใบไม้จมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วปิดฝาไม่ต้องแน่น

3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกๆ 12 ชั่วโมง คือ ชั่วโมงที่ 0, 24, 48 และ 72

4. นำตัวอย่างที่เก็บจากข้อ 3 มาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสซึ่งเป็น crude enzyme ทำการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูโลสและปริมาณกลูโคสโดยใช้วิธี Somogyi-Nelson

3.6.4 การศึกษาการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อแบคทีเรีย *Leifsonia* sp.

1. นำหัวเชื้อแบคทีเรีย *Leifsonia* sp. จากข้อ 3.6.1 มาดูดใส่ลงในอาหารเหลว NB และ CMC ปริมาตร 500 มิลลิลิตร อย่างละ 25 มิลลิลิตร

2. ใส่ลงในขวดบ่มที่มีใบไม้แห้งที่ 20, 40 และ 60 กรัม โดยกดให้ใบไม้จมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วปิดฝาไม่ต้องแน่น

3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกๆ 12 ชั่วโมง คือ ชั่วโมงที่ 0, 24, 48 และ 72

4. นำตัวอย่างที่เก็บจากข้อ 3 มาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสซึ่งเป็น crude enzyme ทำการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูโลสและปริมาณกลูโคสโดยใช้วิธี Somogyi-Nelson

3.6.5 การศึกษาการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยไม่มีการใส่เชื้อ

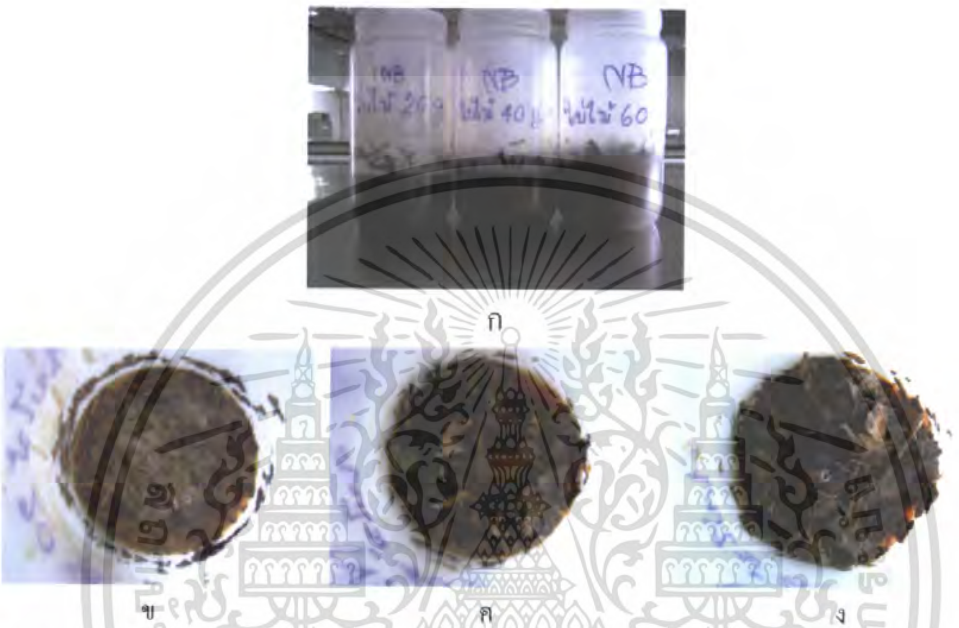
1. เตรียมอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ NB และ CMC ใส่ลงในขวดบ่มที่บรรจุใบไม้แห้งที่ 20, 40 และ 60 กรัม ที่โดยกดให้ใบไม้จมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เทลงไป แล้วปิดฝาไม่ต้องแน่น

2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกๆ 12 ชั่วโมง คือ ชั่วโมงที่ 0, 24, 48 และ 72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

3. นำตัวอย่างที่เก็บจากข้อ 2 มาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสซึ่งเป็น crude enzyme ทำการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูโลสและปริมาณกลูโคสโดยใช้วิธี Somogyi-Nelson



ก

ข ค ง

ภาพที่ 3.2 การย่อยสลายเซลลูโลสในใบไม้แห้งโดยไม่ใส่เชื้อ ในอาหารเหลว NB

ก ด้านข้างของการย่อยสลายเซลลูโลสที่ใบไม้แห้ง 20, 40 และ 60 กรัม

ข ด้านบนของการย่อยสลายเซลลูโลสที่ใบไม้ 20 กรัม

ค ด้านบนของการย่อยสลายเซลลูโลสที่ใบไม้ 40 กรัม

ง ด้านบนของการย่อยสลายเซลลูโลสที่ใบไม้ 60 กรัม

3.7 การวิเคราะห์

3.7.1 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูโลสตามวิธีของรุจิกาญจน์ (2546) (ภาคผนวก ข)

3.7.2 วิเคราะห์ปริมาณกลูโคสโดยวิธี Somogyi-Nelson (Association of Official Chemists)

3.8 สถานที่ดำเนินการทดลอง

ห้องปฏิบัติการภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร ห้อง D 318 และ D317 สาขาเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

85420

3.9 ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

เดือนพฤศจิกายน 2550-มีนาคม 2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

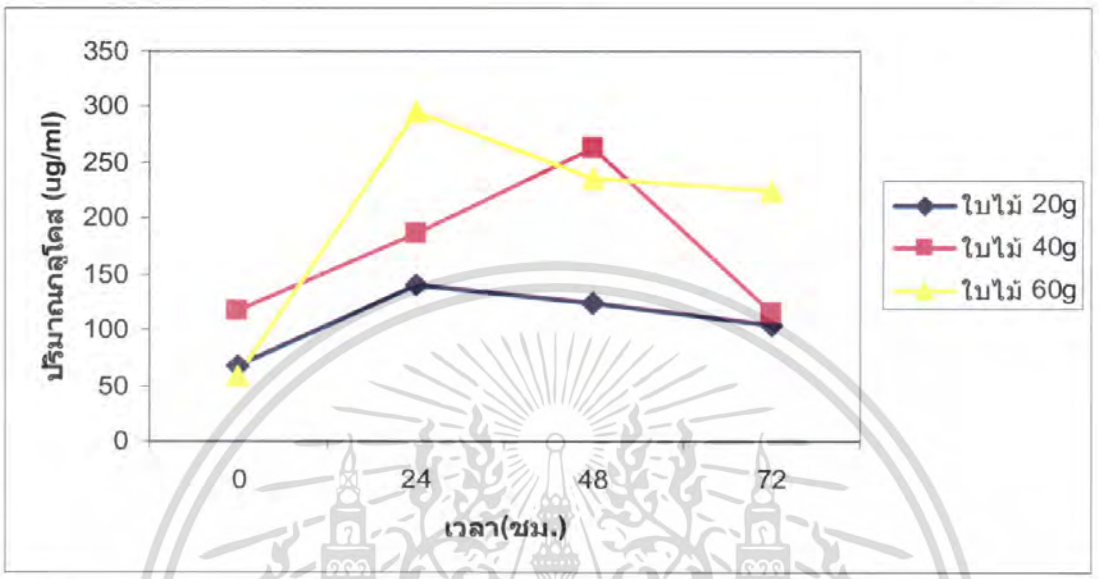
บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ *Bacillus* sp. strain 8

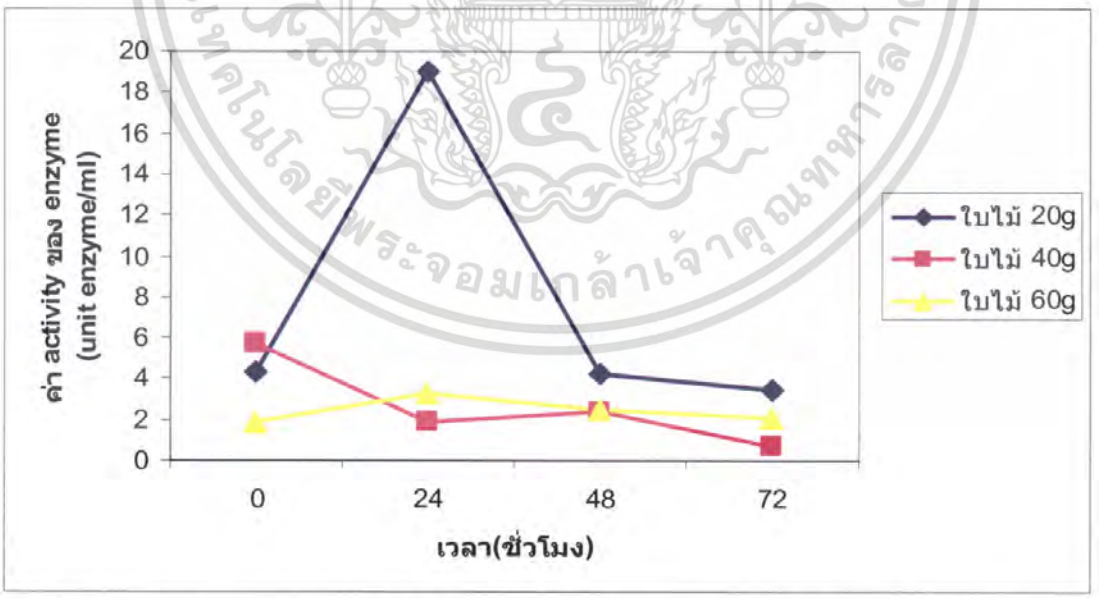
จากการทดลองการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ *Bacillus* sp. strain 8 โดยใช้อาหารเหลว NB และ CMC ปริมาณ 500 มิลลิลิตร ใส่ลงในใบไม้แห้ง 20 , 40 และ 60 กรัม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพผลการทดลองและเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกๆ 12 ชั่วโมง คือ ที่ 0, 24, 48, และ 72 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างน้ำหมักไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำส่วนใส่ซึ่งเป็น crude enzyme มาวัดโดยค่าดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร จากกราฟที่ 4.1-4.4 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลจากการย่อยสลายเซลลูโลสและการวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส จากอาหารเหลว NB และ CMC พบว่าปริมาณกลูโคสแปรผันตามค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส คือ เมื่อเชื้อผลิตกลูโคสออกมาได้สูงปริมาณหนึ่งแล้วเชื้อจะหยุดหรือลดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลง ดังนั้นจึงทำให้ปริมาณกลูโคสลดลงด้วย นั้นก็แสดงว่าเกิดการย่อยสลายเซลลูโลสในใบไม้แห้ง ในอาหารเหลว NB สภาวะที่ผลิตกลูโคสออกมาสูงสุดคือที่ชั่วโมงที่ 24 ใบไม้ 60 กรัม ให้ปริมาณกลูโคส 282.608 $\mu g / ml$ และในอาหารเหลว CMC สภาวะที่ผลิตกลูโคสออกมาสูงสุดคือที่ ชั่วโมงที่ 24 ใบไม้ 60 กรัม ให้ปริมาณกลูโคส 867.311 $\mu g / ml$ เพราะฉะนั้นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยสลายเซลลูโลสในใบไม้แห้งโดยเชื้อ *Bacillus* sp. strain 8 คือชั่วโมงที่ 24 ใบไม้ 60 กรัม ในอาหารเหลว CMC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผลการ

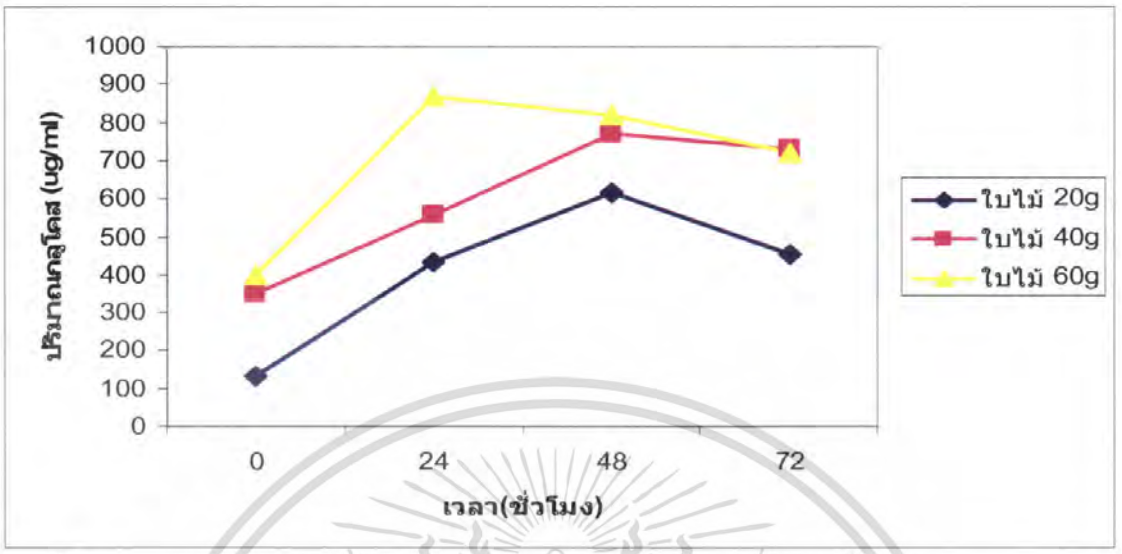


ภาพที่ 4.1 : ผลปริมาณกลูโคส (*µg / ml*) จากการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ *Bacillus* sp. strain 8 ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ NB เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

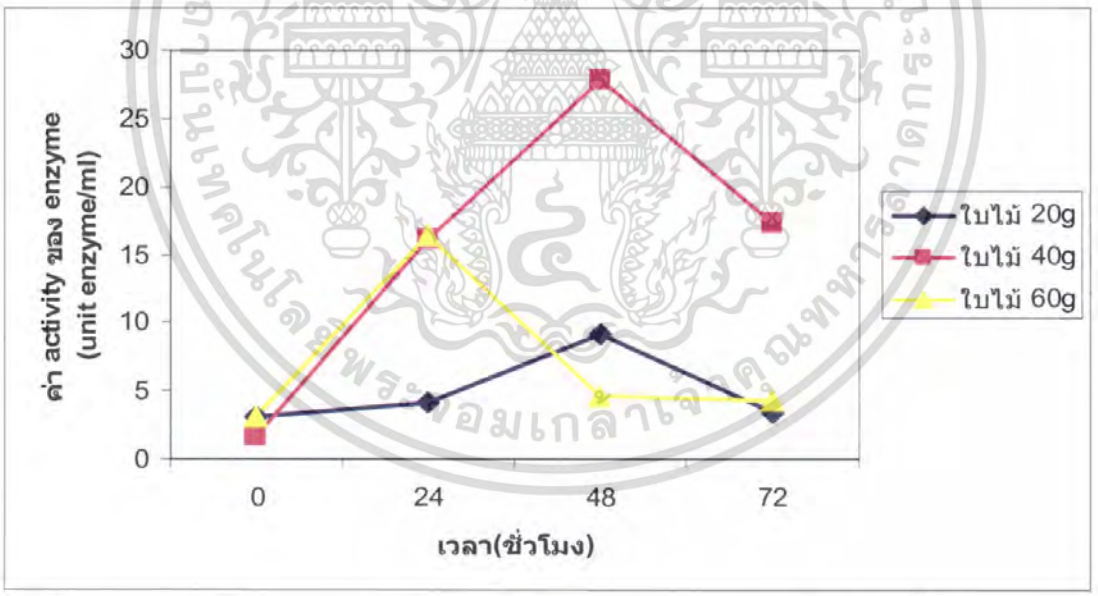


ภาพที่ 4.2 : ผลค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ *Bacillus* sp. strain 8 ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ NB เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.3 : ผลปริมาณกลูโคส (*µg / ml*) จากการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ *Bacillus* sp. strain 8 ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ CMC เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.4 : ผลค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ*Bacillus* sp. strain 8 ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ CMC เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

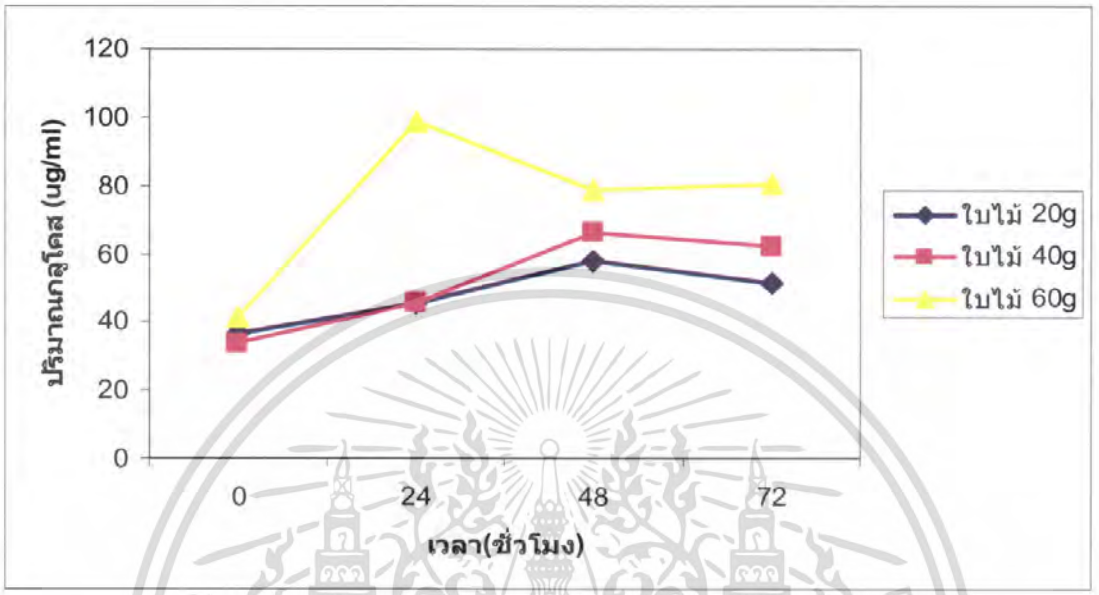
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ *Bacillus* sp. strain 17

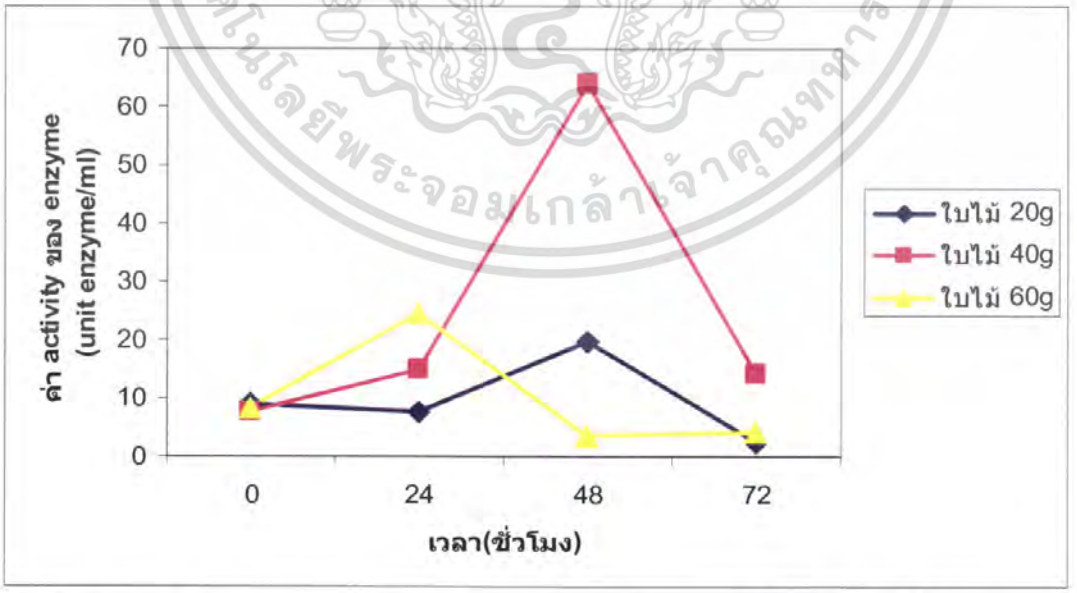
จากการทดลองการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ *Bacillus* sp. strain 17 โดยใช้อาหารเหลว NB และ CMC ปริมาณ 500 มิลลิลิตร ใส่ลงในใบไม้แห้ง 20 , 40 และ 60 กรัม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพผลการทดลองและเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกๆ 12 ชั่วโมง คือ ที่ 0, 24, 48, และ 72 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างน้ำหมักไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำส่วนใส่ซึ่งเป็น crude enzyme มาวัดโดยค่าดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร จากกราฟที่ 4.5-4.8 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลจากการย่อยสลายเซลลูโลสและการวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส จากอาหารเหลว NB และ CMC พบว่าปริมาณกลูโคสแปรผันตามค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส คือ เมื่อเชื้อผลิตกลูโคสออกมาได้สูงปริมาณหนึ่งแล้วเชื้อจะหยุดหรือลดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลง ดังนั้นจึงทำให้ปริมาณกลูโคสลดลงด้วย แต่จากภาพการทดลองที่ 4.5-4.8 ปริมาณกลูโคสมีปริมาณเพิ่มขึ้นสูงแต่ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสนั้นมีค่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยนั้นแสดงว่าการเกิดค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพียงเล็กน้อยก็สามารถผลิตกลูโคสออกมาได้ในปริมาณที่สูงได้ ในอาหารเหลว NB สภาวะที่ผลิตกลูโคสออกมาสูงสุดคือที่ชั่วโมงที่ 24 ใบไม้ 60 กรัม ให้ปริมาณกลูโคส 98.924 μg / ml และในอาหารเหลว CMC สภาวะที่ผลิตกลูโคสออกมาสูงสุดคือที่ ชั่วโมงที่ 24 ใบไม้ 60 กรัมให้ปริมาณกลูโคส 132.062 μg / ml เพราะฉะนั้นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยสลายเซลลูโลสในใบไม้แห้งโดยเชื้อ *Bacillus* sp. strain 17 คือชั่วโมงที่ 24 ใบไม้ 60 กรัม ในอาหารเหลว CMC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผลการทดลอง

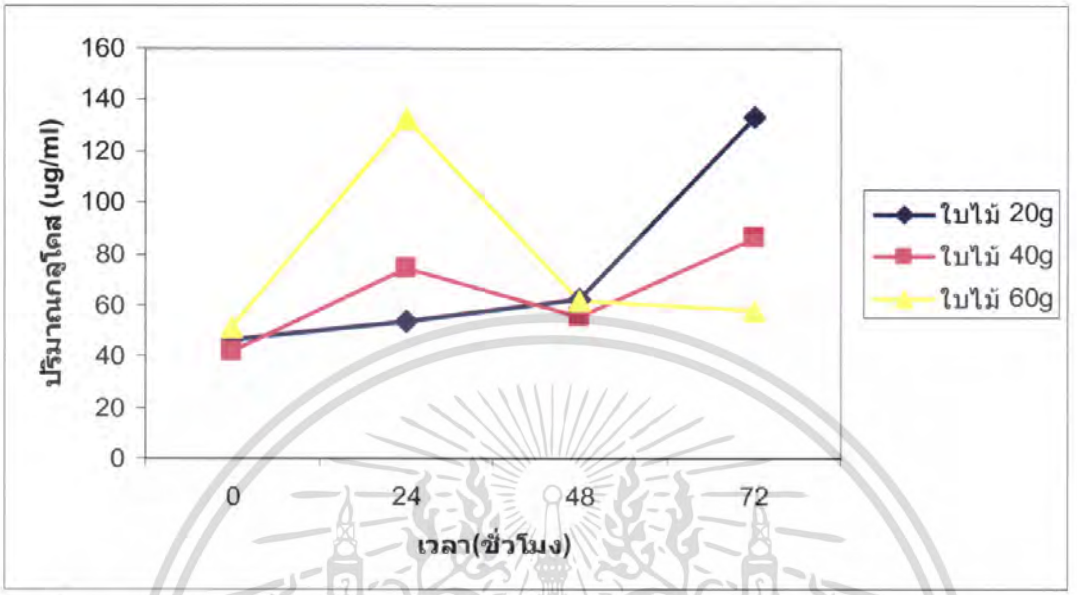


ภาพที่ 4.5 : ผลปริมาณกลูโคส (μg / ml) จากการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ *Bacillus* sp. strain 17 ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ NB เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

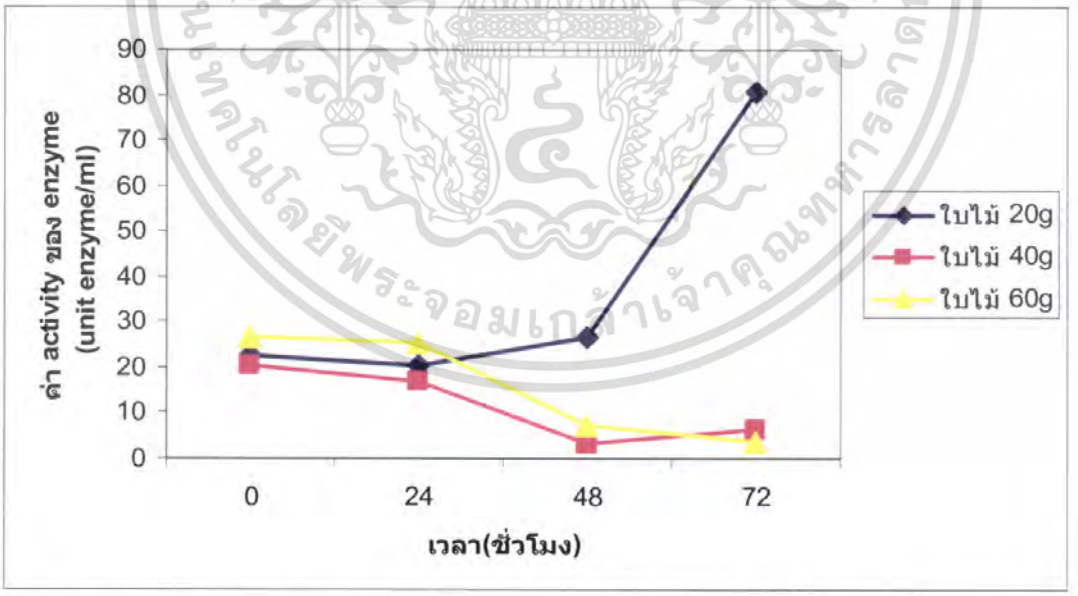


ภาพที่ 4.6 : ผลค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ*Bacillus* sp. strain 17ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ NB เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.7 : ผลปริมาณกลูโคส (μg / ml) จากการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ *Bacillus* sp. strain 17ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อCMC เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



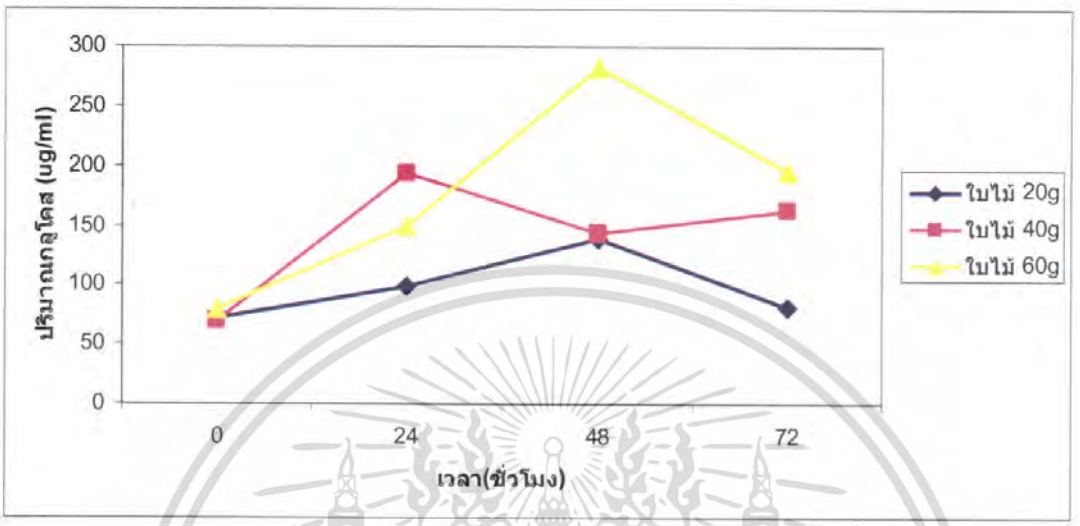
ภาพที่ 4.8 : ผลค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ *Bacillus* sp. strain 17ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ CMC เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

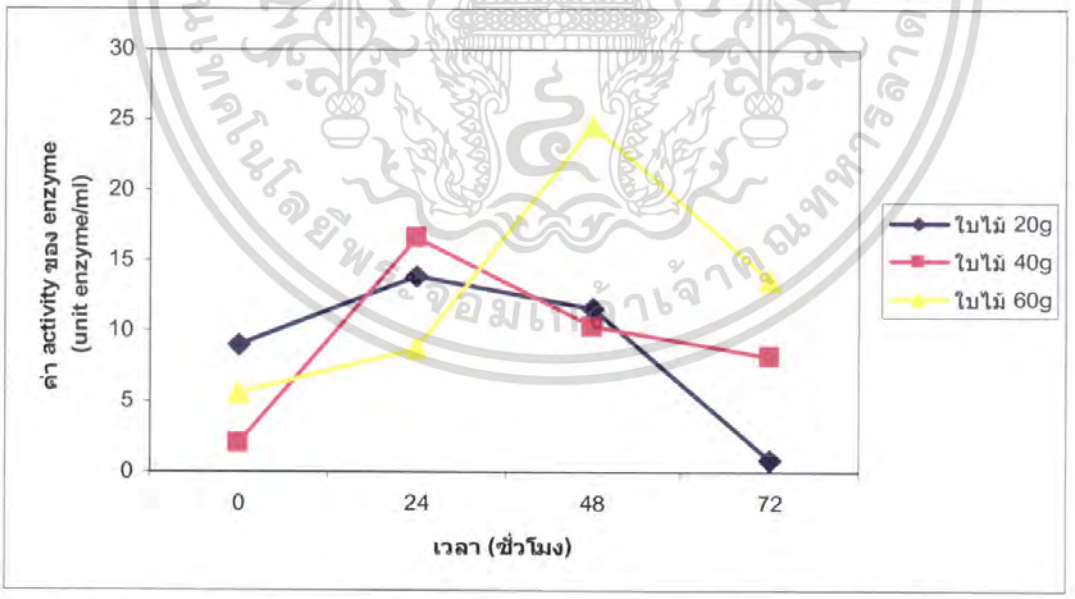
4.3 การย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ *Leifsonia sp.* strain 43

จากการทดลองการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ *Leifsonia sp.* strain 43 โดยใช้อาหารเหลว NB และ CMC ปริมาณ 500 มิลลิลิตร ใส่ลงในใบไม้แห้ง 20 , 40 และ 60 กรัม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพผลการทดลองและเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกๆ 12 ชั่วโมง คือ ที่ 0, 24, 48, และ 72 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างน้ำหมักไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำส่วนใส่ซึ่งเป็น crude enzyme มาวัดโดยค่าดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร จากกราฟที่ 4.9-4.12 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลจากการย่อยสลายเซลลูโลสและการวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส จากอาหารเหลว NB และ CMC พบว่าปริมาณกลูโคสแปรผันตามค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส คือ เมื่อเชื้อผลิตกลูโคสออกมาได้สูงปริมาณหนึ่ง แล้วเชื้อจะหยุดหรือลดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลง ดังนั้นจึงทำให้ปริมาณกลูโคสลดลง แสดงว่าการเกิดย่อยสลายเซลลูโลสในใบไม้แห้งได้ ในอาหารเหลว NB สภาวะที่ผลิตกลูโคสออกมาสูงสุดคือที่ชั่วโมงที่ 48 ใบไม้ 60 กรัม ให้ปริมาณกลูโคส 282.160 $\mu g / ml$ และในอาหารเหลว CMC สภาวะที่ผลิตกลูโคสออกมาสูงสุดคือที่ ชั่วโมงที่ 48 ใบไม้ 60 กรัม ให้ปริมาณกลูโคส 584.171 $\mu g / ml$ เพราะฉะนั้นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยสลายเซลลูโลสในใบไม้แห้งโดยเชื้อ *Leifsonia sp.* strain 43 คือ ชั่วโมงที่ 24 ใบไม้ 60 กรัม ในอาหารเหลว CMC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

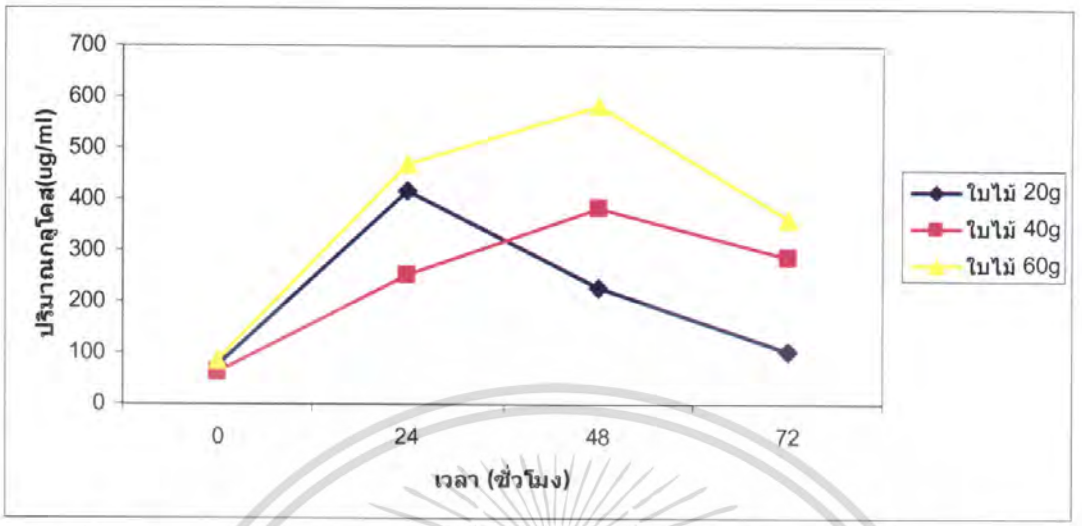


ภาพที่ 4.9 : ผลปริมาณกลูโคส (*µg / ml*) จากการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ *Leifsonia sp.* strain 43 ในอาหารเหลว NB เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

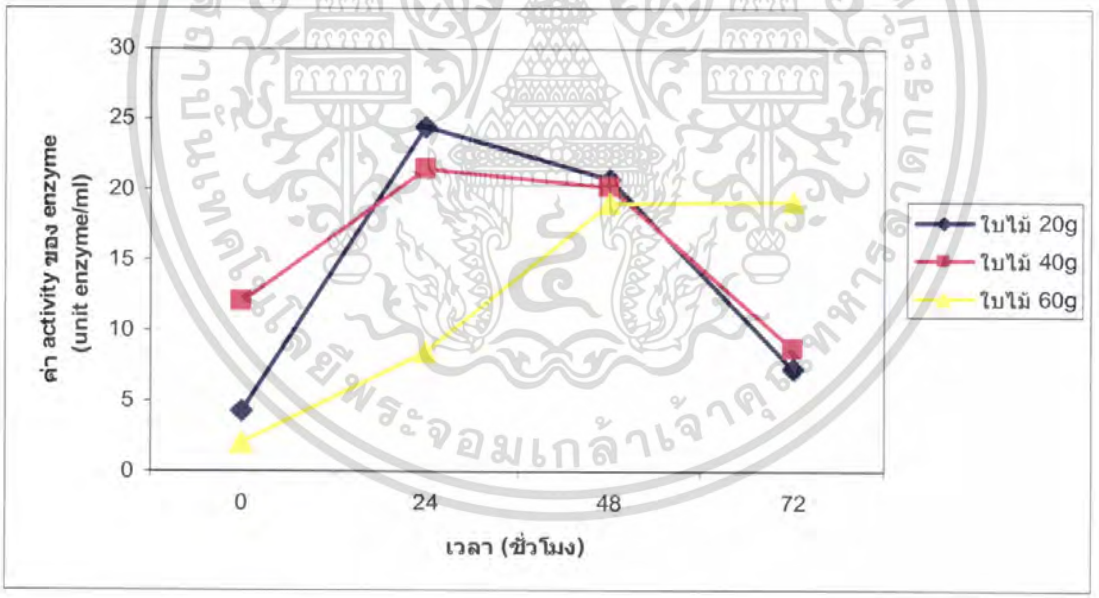


ภาพที่ 4.10 : ผลค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ *Leifsonia sp.* strain 43 ในอาหารเหลว NB เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.11 : ผลปริมาณกลูโคส (*µg / ml*) จากการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ *Leifsonia sp.* strain 43 ในอาหารเหลว CMC เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



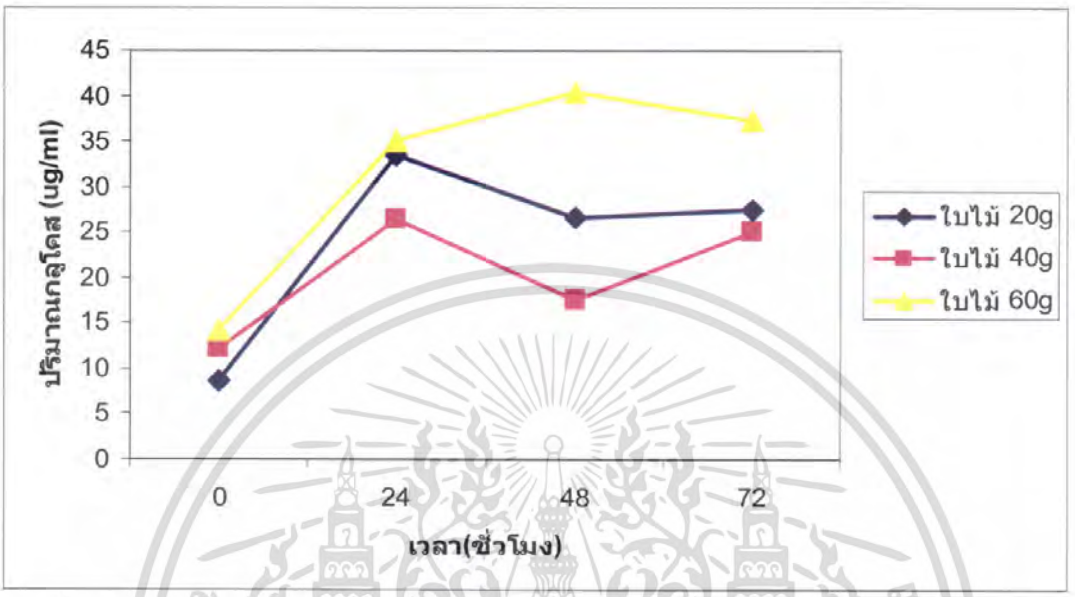
ภาพที่ 4.12 : ผลค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยเชื้อ *Leifsonia sp.* strain 43 ในอาหารเหลว CMC เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

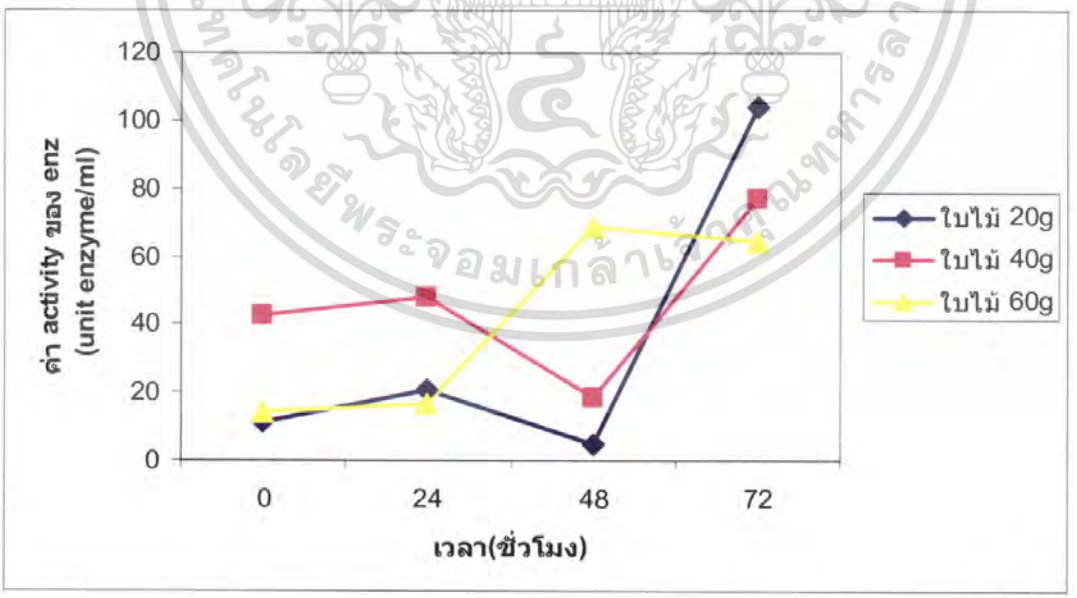
4.4 การย่อยสลายใบไม้แห้งโดยไม่ใส่เชื้อ

จากการทดลองการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยไม่ใส่เชื้อเพิ่ม โดยใช้อาหารเหลว NB และ CMC ที่มีใบไม้แห้งปริมาณ 20 , 40 และ 60 กรัม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกๆ 12 ชั่วโมง คือ ที่ 0, 24, 48, และ 72 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสจากการย่อยสลายเซลลูโลสและการวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ดังแสดงดังภาพที่ 4.13-4.16โดยไม่ใส่เชื้อพบว่าปริมาณกลูโคสแปรผันตามค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส คือ เมื่อเชื้อผลิตกลูโคสออกมาได้สูงปริมาณหนึ่งแล้วเชื้อจะหยุดหรือลดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลง ดังนั้นจึงทำให้ปริมาณกลูโคสลดลง แสดงว่าการเกิดย่อยสลายเซลลูโลสในใบไม้แห้งได้ ในกรณีที่ไม่ใส่เชื้อแล้วมีการย่อยสลายเซลลูโลสในใบไม้แห้งนั้นเกิดจากเชื้อจากแหล่งธรรมชาติที่ติดมากลับใบไม้แห้งที่นำมาทำการทดลองในอาหารเหลว NB สภาวะที่ผลิตกลูโคสออกมาสูงสุดคือที่ชั่วโมงที่ 48 ใบไม้ 60 กรัม ให้ปริมาณกลูโคส 40.267 $\mu g / ml$ และในอาหารเหลว CMC สภาวะที่ผลิตกลูโคสออกมาสูงสุดคือที่ ชั่วโมงที่ 48 ใบไม้ 60 กรัม ให้ปริมาณกลูโคส 94.107 $\mu g / ml$ เพราะฉะนั้นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยสลายเซลลูโลสในใบไม้แห้งโดยไม่ใส่เชื้อ คือชั่วโมงที่ 48 ใบไม้ 60 กรัม ในอาหารเหลว CMC แต่อย่างไรก็ตามการผลิตกลูโคสโดยไม่ใส่เชื้อนั้นจะให้ปริมาณกลูโคสที่ต่ำกว่าการย่อยสลายที่มีการใส่เชื้อแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

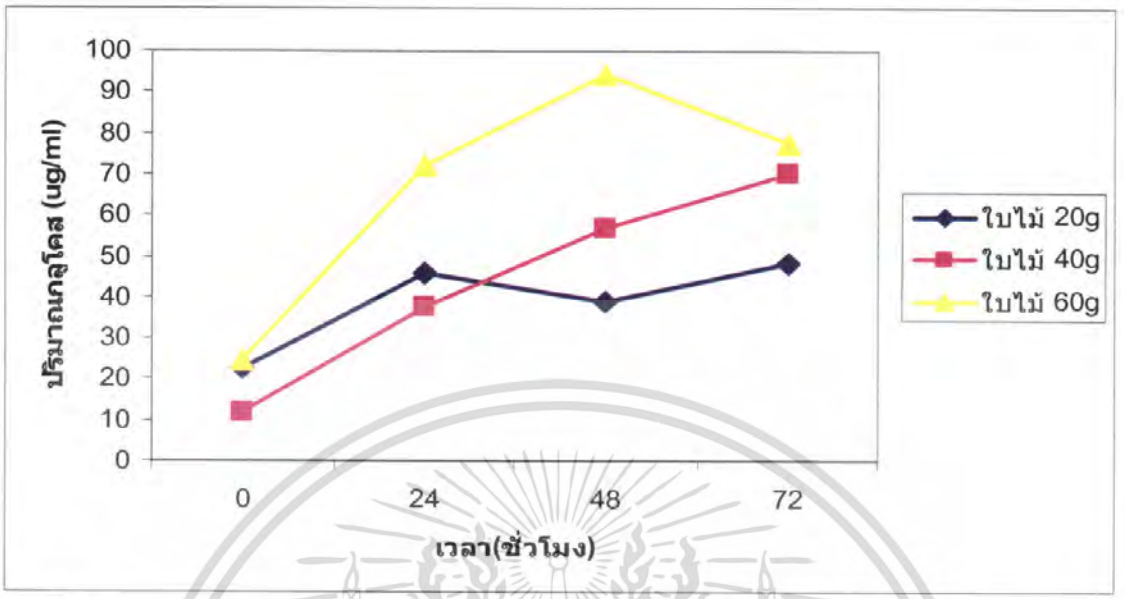


ภาพที่ 4.13 : ผลปริมาณกลูโคส (*μg / ml*) จากการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยไม่ใส่เชื้อเพิ่มในอาหารเหลว NB เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

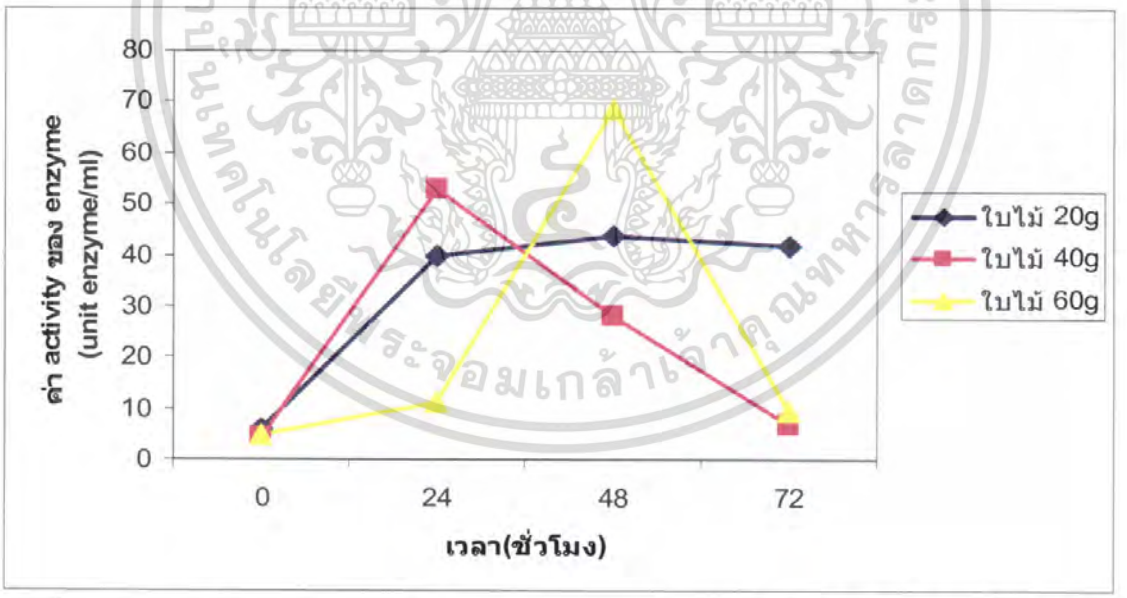


ภาพที่ 4.14 : ผลค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยไม่ใส่เชื้อเพิ่มในอาหารเหลว NB เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.15 : ผลปริมาณกลูโคส ($\mu g / ml$) จากการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยไม่ใส่เชื้อเพิ่มในอาหารเหลว CMC เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.16 : ผลค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยไม่ใส่เชื้อเพิ่มในอาหารเหลว CMC เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองเพื่อศึกษาหาชนิดและสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย รวมไปถึงสภาวะ แหล่งอาหารและเวลาของการย่อยสลายเซลลูโลสในใบไม้แห้ง พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. strain 8 และ17 และ *Leifsonia sp.* strain 43 มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยเซลลูโลสในอาหารเหลว CMC ได้ดีกว่าอาหารเหลว NB โดยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. strain 8 สามารถย่อยสลายเซลลูโลสจากใบไม้แห้งได้ในปริมาณสูงสุด ให้ปริมาณกลูโคส 867.311 $\mu g / ml$ ในชั่วโมงที่ 24 ที่ใบไม้ 60 กรัม รองลงมาคือเชื้อ *Leifsonia sp. strain* 43 ให้ปริมาณกลูโคส 584.171 $\mu g / ml$ ในชั่วโมงที่ 48 ที่ใบไม้ 60 กรัม และ *Bacillus* sp. *strain* 17 ให้ปริมาณกลูโคส 132.062 $\mu g / ml$ ในชั่วโมงที่ 24 ที่ใบไม้ 60 กรัม ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าเวลาที่ให้ผลดีที่สุดคือ ชั่วโมงที่ 24 รองลงมาคือชั่วโมงที่ 48, 72 และ 0 ตามลำดับ และปริมาณใบไม้ที่เหมาะสมที่สุดคือที่ใบไม้แห้ง 60 กรัม รองลงมาคือใบไม้แห้ง 40 และ 20 กรัม ตามลำดับ และจากการย่อยสลายใบไม้แห้งโดยไม่ใส่เชื้อนั้นพบว่าสามารถเกิดค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายเซลลูโลสได้เช่นกันแต่จะให้ปริมาณกลูโคสที่ต่ำกว่าเมื่อมีการใส่เชื้อแบคทีเรียในการย่อยสลาย ปริมาณกลูโคสที่ได้คือ 94.107 $\mu g / ml$ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว CMC ชั่วโมงที่ 48 ที่ใบไม้ 60 กรัม และที่อาหารเหลว NB มีปริมาณกลูโคส 94.107 $\mu g / ml$ ชั่วโมงที่ 48 ที่ใบไม้ 60 กรัม ซึ่งในอาหารเหลว CMC มีความเหมาะสมมากกว่า อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ NB และการย่อยสลายเซลลูโลสโดยการใส่เชื้อแบคทีเรีย จะได้ผลดีกว่าเมื่อไม่ใส่เชื้อ

จากการทดลองนี้ได้สอดคล้องกับการทดลองศึกษาหาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. strain 8 เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ (จิตราวดี สมศรี และ นางสาวศุภพร อินทร์พรหม ,2550) นอกจากนี้แบคทีเรียนี้เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตกลูโคสได้ในปริมาณสูงด้วย ดังนั้นจึงสามารถนำสายพันธุ์นี้ไปทำการศึกษาต่อไปเพื่อนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

การวิจัยเพื่อหาแนวทางการผลิตจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและอุตสาหกรรมการเกษตร (2547) [online].เข้าถึงได้จาก http://siweb.dss.go.th/article/show_atricle.asp?article_ID=500 http://www.sut.ac.th/e-texts/Agri/Ruminant%20Nutrition/unit%205.1.htm,

จิตราวดี สมศรี, ศุภพร อินทร์พรหม. 2550. **การศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ,** สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

เซลลูโลส. 2004. [online].เข้าถึงได้จาก : http://61.19.145.8/student/m5year2006-2/504/group06/duty&blame.html, http://www.elib-online.com/doctors/food_enzyme01.html

ธันยธรณ์ ปิยชัยเศรษฐ์ และ เอกรัตน์ อุ่นบางตลาด. 2549. **การคัดเลือกจุลินทรีย์จากแหล่งธรรมชาติเพื่อใช้ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส และเซลลูเลส,** สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

เทคโนโลยีชีวภาพ พัฒนาผลผลิตทางการเกษตร. 2547. ฝ่ายวิจัย ธนาคารกรุงศรีอยุธยา จำกัด (มหาชน). [online]. เข้าถึงได้จาก : http://www. Krungri.com /PDF/ Economy/analysis/march47_03.pdf

บาซิลลัส (Bacillus) [online].เข้าถึงได้จาก : http://www.gogi-foods.com/index.php?lay=show&ac=article&Id=178099&Ntype=4, http://www.techno.msu.ac.th/fn/ecenter/pathogens/bacillus_cereus_and_other_bacill.htm, http://foodsafety.nfi.or.th/pdf/webfoodsafety/forconsumar/Manage/Micro

บาซิลลัส ซีเรียส (*Bacillus cereus*) แผนกวิเคราะห์ข้อมูล ฝ่ายบริการข้อมูลและสารสนเทศ สถาบันอาหาร โทร. 02 886 8088, กรุงเทพฯ.

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2543. **จุลชีววิทยาทั่วไป** ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.บูรพา, วราวุฒิ ครูส่ง เทคโนโลยีชีวภาพ ภาค วิชา เทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยีการเกษตร ม.พระจอมเกล้าเจ้าคุณลาดกระบัง.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2543. **เอนไซม์ทางอาหาร.** จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.

ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร [online].เข้าถึงได้จาก : http://www.dede.go.th/dede/index.php?id=437

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

ปียะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2543. GMOs ฉบับผู้ประกอบการ. การสัมมนามาตรการและข้อกำหนดเกี่ยวกับ**การควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยของอาหารของประเทศในทวีปยุโรป** ระหว่างวันที่ 14-15 มีนาคม 2543 ณ ห้องประชุมใหญ่ สถาบันฝึกอบรมการค้าระหว่างประเทศ กรมส่งเสริมการส่งออก.

ปียะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2543. **การสร้างสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรมและประเด็นปัญหา**. เอกสารประกอบการประชุมสัมมนางานสัปดาห์วิทยาศาสตร์แห่งชาติ 16 สิงหาคม 2543 ณ มหาวิทยาลัยนเรศวร.

ปียะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. สินค้า GMOs. 2543. : **ความมั่นคงและความปลอดภัยทางด้านอาหารและการบริโภค**. ภาควิชาพฤกษศาสตร์. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รุจิกาญจน์ นาสนิท. 2546. **วิทยานิพนธ์ เรื่องการศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสและยีนที่เกี่ยวข้องจากแบคทีเรียในลำไส้ปลวก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์**, กรุงเทพฯ.

สุฤทัย ล้ำประเสริฐ. 2543. **การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส**, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

AOAC (Association of Official Chemists) เอโอเอซี (สมาคมนักเคมีวิเคราะห์ทางการ) : สมาคมซึ่งมีบทบาทสำคัญในการกำหนดวิธีวิเคราะห์ทางเคมีเพื่อใช้เป็นมาตรฐานของการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการทางเคมีทั่วโลก **วิธีวิเคราะห์กลูโคสโดยวิธี Samogyi-Nelson**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA)

beef extract	3.0	กรัม
peptone	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB)

beef extract	3.0	กรัม
peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

3. อาหารเหลว Carboxymethyl cellulose (CMC)

$NH_4H_2PO_4$	2.0	กรัม
KH_2PO_4	0.6	กรัม
K_2HPO_4	0.4	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
CMC	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

4. Tris HCl buffer

นำสารละลาย Tris (hydroxymethyl) aminomethane 0.1 M และ HCl 0.1 M ผสมกันจนได้ค่า pH เท่ากับ 7.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูโลส

1. เตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคส

1.1 ชั่งกลูโคส 0.010 กรัม

1.2 นำกลูโคสไปอบที่ 200 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

1.3 นำกลูโคสที่ได้จากข้อ 1.2 มาผสมกับน้ำ 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

1.4 ดูดกลูโคสจากข้อ 1.3 ใส่หลอดทดลองในปริมาณ 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ10 มิลลิลิตร ตามลำดับ และใส่น้ำกลั่นปริมาณ 10, 7.5, 5.0, 2.5 และ 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ตามลำดับ ดังตาราง

ความเข้มข้นกลูโคส (ml)	0	2.5	5	7.5	10
น้ำกลั่น (ml)	10	7.5	5	2.5	0

1.5 ปิเปตสารละลายกลูโคสในข้อ1.4 ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำยา Samogyi 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที แล้วทำให้เย็นทันที

1.6 นำมาเติมน้ำยา Nelson 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับ blank ซึ่งใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง

1.7 นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตราฐานกลูโคส

2. การวิเคราะห์เอนไซม์เซลลูโลส

เติมสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลาย CMC ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ที่ละลายในบัฟเฟอร์ Tris-HCl pH 7.5 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มในอ่างที่มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นนำมาหาน้ำตาลรีดิวซ์ในรูปน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นตามวิธีของ Samogyi method (AOAC) และสำหรับหลอดควบคุมใช้สารละลายเอนไซม์

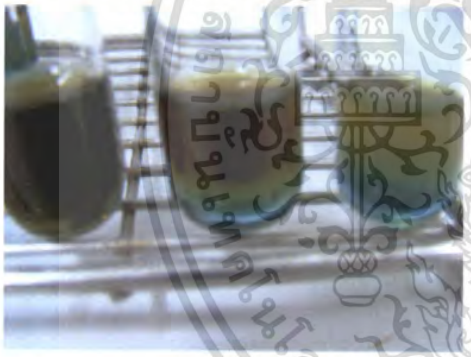
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ในการหากิจกรรมของเอนไซม์นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณเอนไซม์

โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสารตั้งต้นได้เป็นกลูโคส 1 ไมโครโมล ต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยใช้กลูโคสเป็นสารมาตราฐานในการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้น

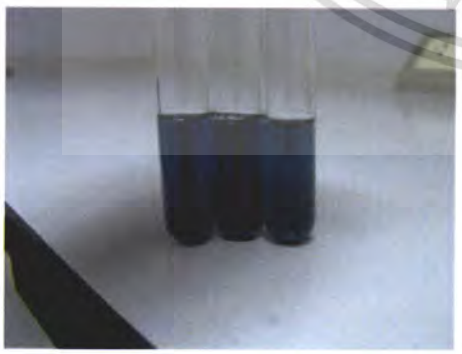
การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส

ปิเปตตัวอย่างน้ำหมักที่เก็บไว้ 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองเติมน้ำยา Samogyi 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที แล้วทำให้เย็นทันที นำมาเติมน้ำยา Nelson 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับ blank ซึ่งใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง อ่านค่าความเข้มข้นของน้ำตาลในตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานที่ได้ ดังแสดงดังภาพภาคผนวกที่ 1 ข



ก

ข



ค

ง

ภาพภาคผนวกที่ 1 ข ขั้นตอนการวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก ตัวอย่างน้ำหมัก 0.5 มิลลิลิตร และน้ำยา Samogyi 1 มิลลิลิตร

ข ต้มในน้ำเดือด 15 นาที

ค เติมน้ำยา Nelson 1 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

ง วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร

การเตรียม reaget

- การเตรียม Samogyi

1. $CuSo_4.5H_2O$ 10 กรัม ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

2. ชั่ง Na_2HPO_2 28 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติม Sodium Potassium Tartate 120 กรัม คนให้ละลายจนหมด แล้วเติมสารละลาย NaOH 1 M 100 มิลลิลิตร เติม Na_2SO_4 anhydrous 120 กรัม เมื่อละลายจนหมดปรับปริมาตรเป็น 900 มิลลิลิตร ตั้งที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน ถ้ามีตะกอนให้กรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4

3. ผสมข้อ 1 และ ข้อ 2 ก่อนใช้

- การเตรียม Nelson

1. ละลาย Ammoniummolybdate $[(NH_4)6Mo_7O_{24}.4H_2O]$ 25 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร เติม H_2SO_4 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2. ละลาย Disodium Arsenate ($Na_2HaSO_4.7H_2O$) 3 กรัม ในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร ผสมสารละลายข้อ 1 และข้อ 2 เข้าด้วยกัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำมาเก็บไว้ในขวดสีชา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

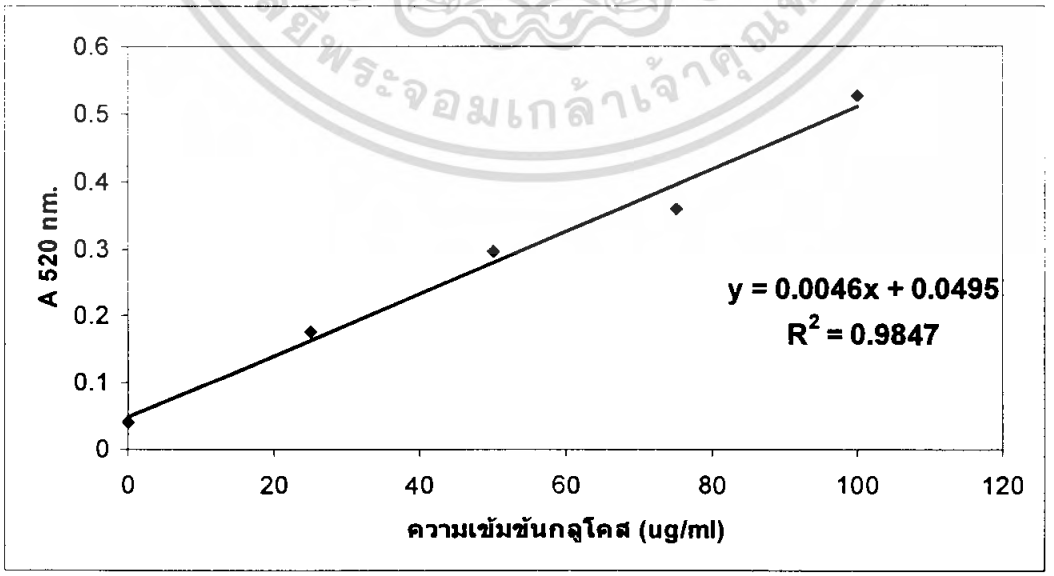
ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

ตารางภาคผนวกที่ 1ค ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตรของสารละลายน้ำตาลกลูโคส

ความเข้มข้นกลูโคส (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่นที่ 520 นาโนเมตร		
	1	2	เฉลี่ย
0	0.005	0.008	0.0065
25	0.096	0.096	0.096
50	0.197	0.195	0.196
75	0.390	0.392	0.391
100	0.585	0.582	0.5835

กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคส (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) กับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

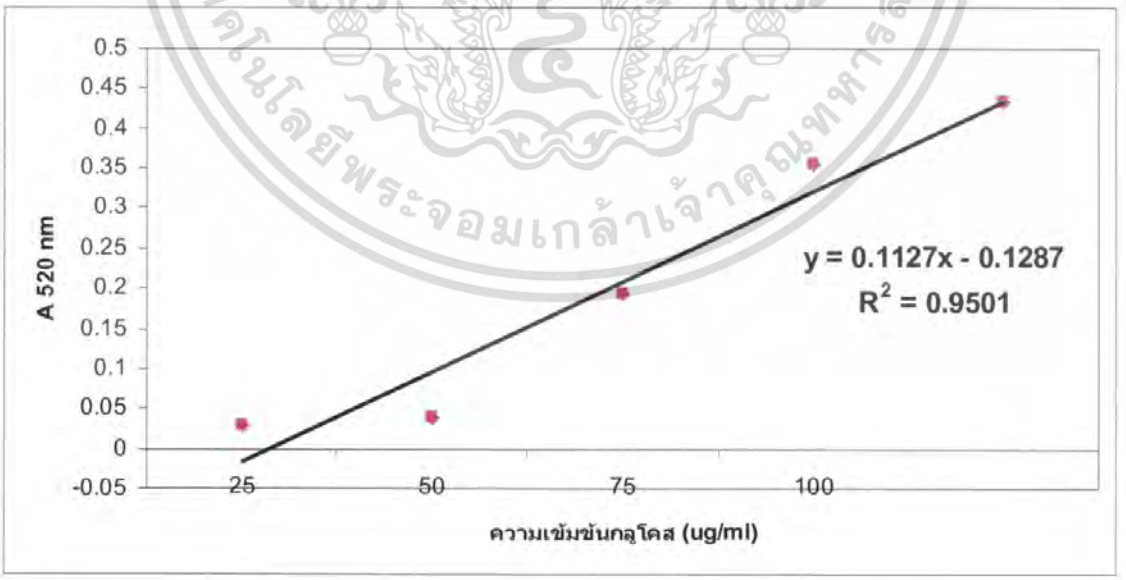


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 2ค ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตรของสารละลายน้ำตาลกลูโคส

ความเข้มข้นกลูโคส (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่นที่ 520 นาโนเมตร		
	1	2	เฉลี่ย
0	0.034	0.043	0.0385
25	0.028	0.027	0.0275
50	0.150	0.236	0.193
75	0.357	0.354	0.3555
100	0.433	0.432	0.4325

กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคส (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) กับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณหาปริมาณน้ำตาล

ตัวอย่างการคำนวณหาปริมาณกลูโคสเชื้อ *Bacillus* sp. strain 8ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB(การทดลองครั้งที่ 2)

จากกราฟมาตรฐานกลูโคสได้สมการ คือ $Y = 0.0046X + 0.0495$

$$X = \frac{Y - 0.00495}{0.0046}$$

$$X = \frac{0.294 - 0.00495}{0.0046}$$

$$X = 53.152 \ \mu g / ml$$

Dilution factor = 0

X คือ ปริมาณกลูโคสที่ได้

ดังนั้นปริมาณกลูโคสเชื้อ *Bacillus* sp. strain 8ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB = 53.152 $\mu g / ml$

การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

ตัวอย่างคำนวณ unit enzyme

1 unit enzyme = 1 mole ของสับสเตรทที่ถูกย่อยใน 1 นาที

= 1 mole ของกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมาใน 1 นาที

= 180 ไมโครกรัมของกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมาใน 1 นาที

ถ้า 0.180 มิลลิกรัมกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมาใน 1 นาที = 1 unit enzyme

1.000 มิลลิกรัมกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมาใน 30 นาที $= \frac{1 \times 30}{0.180}$ unit enzyme

$= 0.185$ unit enzyme

ตัวอย่างการคำนวณ หากิจกรรมของเอนไซม์เชื้อ *Bacillus* sp. strain 8 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB(การทดลองครั้งที่ 2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากกราฟมาตรฐานกลูโคสได้สมการ คือ Y = 0.1127X - 0.1287

$$X = \frac{Y + 0.1287}{0.1127}$$

$$X = \frac{0.280 + 0.1287}{0.1127}$$

$$X = 3.626$$

Dilution factor = No dilute

X คือ ปริมาณกลูโคสที่ได้ในเวลา 30 นาที

∴ แทนค่า = X (0.185) unit enzyme

= 3.626 (0.185) unit enzyme

= 0.670 unit enzyme/ml

ใช้ตัวอย่าง 0.5 ml = 0.670 unit enzyme/ 0.5 ml

= 1.341 unit enzyme/ ml

ดังนั้นกิจกรรมของเอนไซม์เชื้อ *Bacillus* sp. strain 8ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB = 1.341 unit enzyme/ ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

ตารางภาคผนวกที่ 1ง ผลการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 520 nm. ของเชื้อ *Bacillus* sp. strain 8 จาก แหล่งใบไม้แห้งในอาหารเหลว NB เพื่อศึกษาปริมาณกลูโคส($\mu g / ml$) จากการย่อยสลายเซลลูโลส

ชั่วโมงที่	ใบไม้ (กรัม)	ปริมาณกลูโคสที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร		
		การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	เฉลี่ย
0	20	80.089	53.152	66.620
	40	103.839	128.260	116.049
	60	96.964	20.652	58.808
24	20	223.210	58.804	141.007
	40	264.285	108.260	186.272
	60	308.030	282.608	295.319
48	20	179.460	66.847	123.153
	40	255.350	270.652	263.001
	60	283.030	188.043	235.536
72	20	147.321	59.130	103.225
	40	175.000	97.826	114.500
	60	264.285	184.782	224.533

หมายเหตุ ใบไม้แห้งที่นำมาทำการทดลองในครั้งที่ 1 และ 2 มีความแตกต่างกันคือ ใบไม้แห้งในการทดลองครั้งที่ 1 มีความสกปรกและมีความชื้นมากกว่าใบไม้แห้งที่ใช้ในการทดลองครั้งที่ 2 ซึ่งมีความสะอาดและแห้งมากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 2ง ผลการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 520 nm. ของเชื้อ *Bacillus* sp. strain 8 จากแหล่งใบไม้แห้งในอาหารเหลว NB เพื่อ ศึกษาหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)

ชั่วโมงที่	ใบไม้ (กรัม)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร		
		การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	เฉลี่ย
0	20	8.491	0.165	4.328
	40	9.481	1.934	5.707
	60	3.040	0.666	1.853
24	20	37.991	0.079	19.035
	40	3.304	0.365	1.834
	60	5.616	0.940	3.278
48	20	8.259	0.158	4.2085
	40	3.304	1.408	2.356
	60	3.964	1.026	2.495
72	20	5.947	0.862	3.404
	40	0.991	0.310	0.650
	60	1.652	2.462	2.057

หมายเหตุ ใบไม้แห้งที่นำมาทำการทดลองในครั้งที่ 1 และ 2 มีความแตกต่างกันคือ ใบไม้แห้งในการทดลองครั้งที่ 1 มีความสกปรกและมีความชื้นมากกว่าใบไม้แห้งที่ใช้ในการทดลองครั้งที่ 2 ซึ่งมีความสะอาดและแห้งมากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 3ง ผลการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 520 nm. ของเชื้อ *Bacillus* sp. strain 8 จากแหล่งใบไม้แห้งในอาหารเหลว CMC เพื่อศึกษาปริมาณกลูโคส($\mu g / ml$) จากการย่อยสลายเซลลูโลส

ชั่วโมงที่	ใบไม้ (กรัม)	ปริมาณกลูโคสที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร		
		การทดลองครั้งที่1	การทดลองครั้งที่2	เฉลี่ย
0	20	77.589	183.695	130.642
	40	84.910	618.478	351.694
	60	104.910	697.826	401.368
24	20	334.820	535.869	435.344
	40	600.000	515.217	557.608
	60	960.710	773.913	867.311
48	20	521.420	713.043	617.231
	40	767.850	769.565	768.707
	60	742.850	896.739	819.794
72	20	422.320	484.782	453.551
	40	621.420	840.217	730.818
	60	680.350	758.695	719.522

<u>หมายเหตุ</u> ใบไม้แห้งที่นำมาทำการทดลองในครั้งที่ 1 และ 2 มีความแตกต่างกันคือ ใบไม้แห้งในการทดลองครั้งที่ 1 มีความสกปรกและมีความชื้นมากกว่าใบไม้แห้งที่ใช้ในการทดลองครั้งที่ 2 ซึ่งมีความสะอาดและแห้งมากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 4ง ผลการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 520 nm. ของเชื้อ *Bacillus* sp. strain 8 จากแหล่งใบไม้แห้งในอาหารเหลว CMC ศึกษาหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)

ชั่วโมงที่	ใบไม้ (กรัม)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร		
		การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	เฉลี่ย
0	20	4.955	1.364	3.159
	40	1.321	1.787	1.554
	60	0.429	5.749	3.089
24	20	7.598	0.792	4.195
	40	29.071	3.061	16.066
	60	31.384	1.451	16.417
48	20	12.223	5.961	9.092
	40	54.509	1.012	27.760
	60	5.946	3.311	4.628
72	20	6.607	0.161	3.384
	40	32.705	1.924	17.345
	60	2.972	5.732	4.352

<u>หมายเหตุ</u> ใบไม้แห้งที่นำมาทำการทดลองในครั้งที่ 1 และ 2 มีความแตกต่างกันคือ ใบไม้แห้งในการทดลองครั้งที่ 1 มีความสกปรกและมีความชื้นมากกว่าใบไม้แห้งที่ใช้ในการทดลองครั้งที่ 2 ซึ่งมีความสะอาดและแห้งมากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 5ง ผลการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 520 nm. ของเชื้อ *Bacillus* sp. strain 17 จาก แหล่งใบไม้แห้งในอาหารเหลว NB เพื่อศึกษาปริมาณกลูโคส($\mu g / ml$) จากการย่อยสลายเซลลูโลส

ชั่วโมงที่	ใบไม้ (กรัม)	ปริมาณกลูโคสที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร		
		การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	เฉลี่ย
0	20	68.035	4.766	36.400
	40	62.500	4.886	33.693
	60	78.750	3.941	41.345
24	20	86.250	5.352	45.801
	40	86.607	4.748	45.677
	60	179.464	18.385	98.924
48	20	110.714	4.788	57.751
	40	117.857	15.057	66.457
	60	140.178	16.610	78.394
72	20	87.500	15.013	51.256
	40	115.178	15.323	62.250
	60	147.321	12.883	80.102

หมายเหตุ ใบไม้แห้งที่นำมาทำการทดลองในครั้งที่ 1 และ 2 มีความแตกต่างกันคือ ใบไม้แห้งในการทดลองครั้งที่ 1 มีความสกปรกและมีความชื้นมากกว่าใบไม้แห้งที่ใช้ในการทดลองครั้งที่ 2 ซึ่งมีความสะอาดและแห้งมากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 6ง ผลการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 520 nm. ของเชื้อ *Bacillus* sp. strain 17 จากแหล่งใบไม้แห้งในอาหารเหลว NB ศึกษาหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)

ชั่วโมงที่	ใบไม้ (กรัม)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร		
		การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	เฉลี่ย
0	20	12.751	5.371	9.061
	40	10.306	4.622	7.464
	60	11.629	4.791	8.210
24	20	10.570	4.326	7.448
	40	24.450	5.247	14.848
	60	44.260	4.588	24.424
48	20	35.680	3.286	19.483
	40	124.210	3.568	63.889
	60	2.640	4.536	3.588
72	20	1.320	3.292	2.306
	40	24.440	4.069	14.254
	60	4.622	3.469	4.045

หมายเหตุ ใบไม้แห้งที่นำมาทำการทดลองในครั้งที่ 1 และ 2 มีความแตกต่างกันคือ ใบไม้แห้งในการทดลองครั้งที่ 1 มีความสกปรกและมีความชื้นมากกว่าใบไม้แห้งที่ใช้ในการทดลองครั้งที่ 2 ซึ่งมีความสะอาดและแห้งมากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 7ง ผลการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 520 nm. ของเชื้อ *Bacillus* sp. strain 17 จากแหล่งใบไม้แห้งในอาหารเหลว CMC เพื่อศึกษาปริมาณกลูโคส($\mu g / ml$) จากการย่อยสลายเซลลูโลส

ชั่วโมงที่	ใบไม้ (กรัม)	ปริมาณกลูโคสที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร		
		การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	เฉลี่ย
0	20	77.678	15.856	46.767
	40	67.500	15.412	41.456
	60	88.571	14.658	51.614
24	20	89.285	18.340	53.812
	40	128.571	19.538	74.054
	60	242.857	21.268	132.062
48	20	109.821	13.992	61.906
	40	91.964	18.251	55.107
	60	101.785	21.224	61.504
72	20	243.750	23.176	133.463
	40	143.750	27.613	85.681
	60	93.750	22.023	57.886

หมายเหตุ ใบไม้แห้งที่นำมาทำการทดลองในครั้งที่ 1 และ 2 มีความแตกต่างกันคือ ใบไม้แห้งในการทดลองครั้งที่ 1 มีความสกปรกและมีความชื้นมากกว่าใบไม้แห้งที่ใช้ในการทดลองครั้งที่ 2 ซึ่งมีความสะอาดและแห้งมากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 8ง ผลการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 520 nm. ของเชื้อ *Bacillus* sp. strain 17 จากแหล่งใบไม้แห้งในอาหารเหลว CMC ศึกษาหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)

ชั่วโมงที่	ใบไม้ (กรัม)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร		
		การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	เฉลี่ย
0	20	43.38	1.669	22.524
	40	39.050	1.418	20.234
	60	52.790	0.463	26.626
24	20	40.300	0.302	20.301
	40	27.090	6.642	16.866
	60	44.270	5.839	25.054
48	20	52.860	0.492	26.676
	40	5.940	0.505	3.222
	60	8.580	5.183	6.881
72	20	159.230	2.060	80.645
	40	9.250	3.536	6.393
	60	3.305	3.961	3.633

<u>หมายเหตุ</u> ใบไม้แห้งที่นำมาทำการทดลองในครั้งที่ 1 และ 2 มีความแตกต่างกันคือ ใบไม้แห้งในการทดลองครั้งที่ 1 มีความสกปรกและมีความชื้นมากกว่าใบไม้แห้งที่ใช้ในการทดลองครั้งที่ 2 ซึ่งมีความสะอาดและแห้งมากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 9ง ผลการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 520 nm. ของเชื้อ *Leifsonia* sp. Strain 43 จากแหล่งใบไม้แห้งในอาหารเหลว NB เพื่อศึกษาปริมาณกลูโคส($\mu g / ml$) จากการย่อยสลายเซลลูโลส

ชั่วโมงที่	ใบไม้ (กรัม)	ปริมาณกลูโคสที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร		
		การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	เฉลี่ย
0	20	124.107	21.460	72.783
	40	116.964	22.200	69.582
	60	135.714	22.670	79.192
24	20	180.357	17.430	98.893
	40	358.035	30.600	194.317
	60	264.285	34.590	149.437
48	20	248.214	30.820	139.517
	40	245.535	39.740	142.637
	60	512.500	42.820	282.160
72	20	183.928	22.010	80.959
	40	291.964	32.380	162.172
	60	362.500	27.530	195.015

หมายเหตุ ใบไม้แห้งที่นำมาทำการทดลองในครั้งที่ 1 และ 2 มีความแตกต่างกันคือ ใบไม้แห้งในการทดลองครั้งที่ 1 มีความสกปรกและมีความชื้นมากกว่าใบไม้แห้งที่ใช้ในการทดลองครั้งที่ 2 ซึ่งมีความสะอาดและแห้งมากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 10ง ผลการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 520 nm. ของเชื้อ *Leifsonia* sp.strain 43 จากแหล่งใบไม้แห้งในอาหารเหลว NB เพื่อศึกษาหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)

ชั่วโมงที่	ใบไม้ (กรัม)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร		
		การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	เฉลี่ย
0	20	14.860	3.060	8.975
	40	33.040	0.127	2.054
	60	10.570	3.290	5.596
24	20	27.750	0.096	13.923
	40	3.960	0.148	16.583
	60	14.210	0.914	8.750
48	20	23.120	0.623	11.582
	40	15.200	0.045	10.285
	60	48.230	5.371	24.572
72	20	0.330	1.429	0.879
	40	13.880	2.456	8.168
	60	23.130	4.006	13.568

หมายเหตุ ใบไม้แห้งที่นำมาทำการทดลองในครั้งที่ 1 และ 2 มีความแตกต่างกันคือ ใบไม้แห้งในการทดลองครั้งที่ 1 มีความสกปรกและมีความชื้นมากกว่าใบไม้แห้งที่ใช้ในการทดลองครั้งที่ 2 ซึ่งมีความสะอาดและแห้งมากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 11ง ผลการวัดค่าดูดกลืนแสงที่520 nm. ของเชื้อ *Leifsonia* sp. strain 43 จากแหล่งใบไม้แห้งในอาหารเหลว CMCเพื่อศึกษาปริมาณกลูโคส($\mu g / ml$) จากการย่อยสลายเซลลูโลส

ชั่วโมงที่	ใบไม้ (กรัม)	ปริมาณกลูโคสที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร		
		การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	เฉลี่ย
0	20	141.964	12.710	77.337
	40	109.821	12.830	61.325
	60	154.464	15.130	84.797
24	20	805.357	26.830	416.093
	40	485.714	18.640	252.177
	60	892.857	43.300	468.078
48	20	425.000	29.740	227.370
	40	721.428	40.740	381.083
	60	1138.392	29.950	584.171
72	20	179.464	26.83	102.997
	40	533.928	41.250	287.589
	60	677.678	50.060	360.869

หมายเหตุ ใบไม้แห้งที่นำมาทำการทดลองในครั้งที่ 1 และ 2 มีความแตกต่างกันคือ ใบไม้แห้งในการทดลองครั้งที่ 1 มีความสกปรกและมีความชื้นมากกว่าใบไม้แห้งที่ใช้ในการทดลองครั้งที่ 2 ซึ่งมีความสะอาดและแห้งมากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 12ง ผลการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 520 nm. ของเชื้อ *Leifsonia* sp. strain 43 จากแหล่งใบไม้แห้งในอาหารเหลว CMC เพื่อศึกษาหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)

ชั่วโมงที่	ใบไม้ (กรัม)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร		
		การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	เฉลี่ย
0	20	7.930	0.591	4.260
	40	23.450	0.436	11.943
	60	3.300	0.579	1.939
24	20	44.600	4.264	24.432
	40	40.970	1.905	21.437
	60	14.870	2.101	8.485
48	20	39.640	1.825	20.732
	40	37.330	2.902	20.116
	60	37.000	0.917	18.958
72	20	10.898	3.557	7.227
	40	14.206	3.287	8.746
	60	35.680	2.483	19.081

หมายเหตุ ใบไม้แห้งที่นำมาทำการทดลองในครั้งที่ 1 และ 2 มีความแตกต่างกันคือ ใบไม้แห้งในการทดลองครั้งที่ 1 มีความสกปรกและมีความชื้นมากกว่าใบไม้แห้งที่ใช้ในการทดลองครั้งที่ 2 ซึ่งมีความสะอาดและแห้งมากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 13ง ผลการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 520 nm. ของน้ำหมักที่ไม่ใส่เชื้อเพิ่มจากแหล่งใบไม้แห้งในอาหารเหลว NB และ CMC เพื่อศึกษาหาปริมาณกลูโคส ($\mu g / ml$) จากการย่อยสลายเซลลูโลส

ชั่วโมงที่	ใบไม้ (กรัม)	ปริมาณกลูโคสที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร	
		อาหารเหลว NB	อาหารเหลว CMC
0	20	8.750	22.678
	40	12.142	11.696
	60	14.107	24.642
24	20	33.392	45.714
	40	26.339	37.410
	60	35.000	71.964
48	20	26.517	39.017
	40	17.500	56.607
	60	40.267	94.107
72	20	27.589	48.482
	40	25.089	69.732
	60	37.232	77.535

หมายเหตุ ใบไม้แห้งมีความชื้นและความสกปรกค่อนข้างมาก ดังนั้นเมื่อไม่มีการใส่เชื้อเพิ่มในการย่อยสลายใบไม้แห้งจึงสามารถมีค่ากิจกรรมในการย่อยสลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 14ง ผลการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 520 nm. ของน้ำหมักที่ไม่ใส่เชื้อเพิ่มจากแหล่งใบไม้แห้งในอาหารเหลว NB และ CMC เพื่อศึกษาหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ เซลลูโลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)

ชั่วโมงที่	ใบไม้ (กรัม)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร	
		อาหารเหลว NB	อาหารเหลว CMC
0	20	11.464	5.746
	40	42.312	4.356
	60	13.913	4.562
24	20	20.478	39.645
	40	47.905	52.860
	60	16.517	11.227
48	20	4.920	43.935
	40	18.500	28.080
	60	68.580	68.712
72	20	104.06	41.625
	40	76.970	6.611
	60	64.420	9.581

หมายเหตุ ใบไม้แห้งมีความชื้นและความสกปรกค่อนข้างมาก ดังนั้นเมื่อไม่มีการใส่เชื้อเพิ่มในการย่อยสลายใบไม้แห้งจึงสามารถมีค่ากิจกรรมในการย่อยสลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นางสาวนันท์นภัส แก้วทิพย์กิจ

- เกิดวันที่ 5 พฤษภาคม พ.ศ. 2529
- สำเร็จการศึกษาชั้นประถมศึกษาจากโรงเรียนอนุสาสน์วิทยา พ.ศ. 2540
- สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาจากโรงเรียนนวมินทราชินูทิศสวนกุหลาบวิทยาลัย สมุทรปราการ พ.ศ. 2546
- จบการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ) คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง พ.ศ.2550

นายสรุจน์ วีรวัฒนโยธิน

- เกิดวันที่ 5 ธันวาคม พ.ศ.2528
- สำเร็จการศึกษาชั้นประถมศึกษาจากโรงเรียนนวมินทราชินูทิศเตรียมอุดมศึกษาพัฒนาการ พ.ศ. 2540
- สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาจากโรงเรียนนวมินทราชินูทิศเตรียมอุดมศึกษาพัฒนาการ พ.ศ. 2546
- จบการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ) คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง พ.ศ.2550

นางสาวสุพัชชา ใจอ่อน

- เกิดวันที่ 2 สิงหาคม พ.ศ.2528
- สำเร็จการศึกษาชั้นประถมศึกษาจากโรงเรียนเฉลิมไฉไล พ.ศ. 2540
- สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาจากโรงเรียนนวมินทราชินูทิศสวนกุหลาบวิทยาลัย สมุทรปราการ พ.ศ. 2546
- จบการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ) คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง พ.ศ.2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้