การย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์ด้วยเอนไซม์ที่สามารถย่อยเยื่อใยได้จากแบคทีเรียในกระเพาะหมักของกระบือ

DIGESTION OF FEEDSTUFFS BY FIBER – DEGRADING ENZYMES FROM BACTERIA IN BUFFALO RUMEN

ทิพาพร งามสงค์

TIPAPORN NGAMSANGA

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2558

KMITL-2015-AG-M-101-193

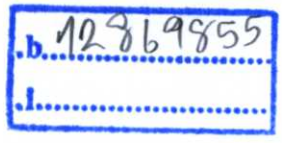
สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์ด้วยเอนไซม์ที่สามารถย่อยเยื่อใยได้จากแบคทีเรียในกระเพาะหมักของกระบือ

DIGESTION OF FEEDSTUFFS BY FIBER – DEGRADING ENZYMES FROM BACTERIA IN BUFFALO RUMEN

ทิภาภรณ์ งามสง่า

TIPAPORN NGAMSANGA



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2558

KMITL-2015-AG-M-101-193

DIGESTION OF FEEDSTUFFS BY FIBER – DEGRADING ENZYMES FROM BACTERIA IN BUFFALO RUMEN

TIPAPORN NGAMSANGA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY
FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2015

KMITL-2015-AG-M-101-193

COPYRIGHT 2015
FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์ด้วยเอนไซม์ที่สามารถย่อยเยื่อใยได้จากแบคทีเรียในกระเพาะหมักของกระบือ

Digestion of Feedstuffs by Fiber-degrading Enzymes from Bacteria in Buffalo Rumen

นักศึกษา นางสาวทิภาภรณ์ งามสง่า

รหัสประจำตัว 54640801

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รศ.ดร.กานต์ สุขสุแพทย์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.กนกรัตน์	ศรีกิจเกษมวัฒน์	
ดร.ปรีดา	เลิศวัชระสารกุล	
รศ.ดร.กานต์	สุขสุแพทย์	
ผศ.ดร.ลำแพน	ขวัญพูล	
ผศ.ดร.กัญญา	จิระเจริญรัตน์	

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

วัน / เดือน/ ปี ที่สอบ 7 กรกฎาคม 2558

สถานที่สอบ ห้องประชุมภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง (ชั้น 3 ตึกบุนนาค L)

คณบดีรับรองแล้ว

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มณฑล แก่นมณี)

คณบดีคณะเทคโนโลยีการเกษตร

วันที่ 15 **เดือน** กรกฎาคม **พ.ศ.** 2558

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์ด้วยเอนไซม์ที่สามารถย่อยเยื่อใยได้จากแบคทีเรียในกระเพาะหมักของกระบือ
นักศึกษา	นางสาวทิภาภรณ์ งามสง่า
รหัสประจำตัว	54640801
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
พ.ศ.	2558
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รศ.ดร.กานต์ สุขสุแพทย์

บทคัดย่อ

การทำวิจัยครั้งนี้จัดทำขึ้นเพื่อศึกษาคุณสมบัติการทำงานของเอนไซม์ที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P1 และ ID2R1P2 ที่จำแนกได้จากกระเพาะหมักของกระบือปลัก โดยทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ การย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์ และการย่อยอาหารไก่สำเร็จรูป จากการศึกษาพบว่า เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากเชื้อทั้งสองไอโซเลทสามารถย่อยสารตั้งต้นคาร์บอกซีเมททิลเซลลูโลส (CMC) ได้ดีที่สุดที่ pH 7.0 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 50°C นาน 10 นาที และเอนไซม์ยังสามารถย่อยสารตั้งต้น ได้แก่ ไซแลน อะไวเซล และกระดาษกรองได้ เอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P1 มีการย่อยข้าวโพด 1 กรัม ให้ได้น้ำตาลกลูโคสสูงสุด 28.09 มิลลิกรัม เอนไซม์สามารถย่อยรำข้าว มันสำปะหลังได้เป็นน้ำตาลกลูโคส 27.48 และ 26.85 มิลลิกรัมกลูโคส ตามลำดับ นอกจากนี้ยังย่อยกากถั่วเหลืองได้น้ำตาลกลูโคส 14.54 มิลลิกรัม เอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P2 สามารถย่อยข้าวโพด 1 กรัม ได้น้ำตาลกลูโคสสูงสุด 27.84 มิลลิกรัม สามารถย่อยรำข้าว มันสำปะหลัง และกากถั่วเหลืองได้น้ำตาลกลูโคส 22.90, 18.39 และ 10.35 มิลลิกรัม ตามลำดับเมื่อทดลองนำเอนไซม์สกัด ปริมาณ 20 ยูนิต มาย่อยอาหารไก่สำเร็จรูป พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย ID2R1P2 สามารถย่อย NDF และ ADF ได้ 4.08% และ 1.77% ตามลำดับย่อยเฮมิเซลลูโลสได้ 2.48% และย่อยลิกนินได้ 0.53% ขณะที่เอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย ID2R1P1 สามารถย่อย NDF และ ADF ได้ 3.12% และ 0.66% ย่อยเฮมิเซลลูโลสได้ 2.46% ตามลำดับแต่ไม่สามารถย่อยลิกนินได้ เอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย ID2R1P2 สามารถย่อยอาหารไก่สำเร็จรูปได้ดีกว่าเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย ID2R1P1 การเสริมเอนไซม์ในอาหารสัตว์น่าจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยของเยื่อใยในอาหารสัตว์ได้

Thesis Title	Digestion of Feedstuffs by Fiber - degrading Enzymes from Bacteria in Buffalo Rumen
Student	Miss Tipaporn Ngamsanga
Student ID.	54640801
Degree	Master of Science
Program	Agricultural Biotechnology
Year	2015
Thesis Advisor	Asst.Prof.Dr.Kanya Jirajaroenrat
Thesis Co-Advisor	Assoc.Prof.Dr. Kan Suksupath

ABSTRACT

The research was conducted to study the properties of the enzymes produced by the bacterial isolates: ID2R1P1 and ID2R1P2, isolated from the rumen of swamp buffalo. The optimum conditions for the enzyme activities, feedstuff digestibility and chicken feed digestibility were studies. The studies found that the crude enzymes produced by both isolates were able to digest carboxymethyl cellulose (CMC) at an optimal condition when incubation in a pH 7.0 buffer at 50°C for 10 minutes. The crude enzymes digested xylan, avicel and filter paper. Enzyme produced by the bacterial isolate ID2R1P1 digested1 gram of corn to 28.09 mg of glucose. The enzyme digested rice bran, cassava chip to 27.48 mg and 26.85 mg of glucose respectively. The enzyme also digested soybean meal to 14.54 mg of glucose. The enzyme produced by bacteria isolates ID2R1P2 digested 1 gram of corn to 27.84 mg of glucose. The enzyme also digested rice bran, cassava chip and soybean meal giving glucose of 22.90, 18.39 and 10.35 mg, respectively. A 20-units crude enzyme from each bacterial isolate was supplemented to a commercial chicken feed. The results showed that the enzyme produced by the bacterial isolate ID2R1P2, digest digested NDF and ADF at 4.08% and 1.77% respectively. Digestibility of hemicellulose and lignin were 2.48% and 0.53% respectively. While the enzyme produced by the bacterial isolate ID2R1P1 digested NDF and ADF at 3.12% and 0.66% respectively. Digestibility of hemicellulose were 2.46%, but lignin was not able to digest. In conclusion, the crude enzyme from the isolate ID2R1P2 was better active to chicken feed than that produced by the isolate

ID2R1P1. Supplementation of the enzymes from the ruminal bacteria may improve the digestibility of fiber in the chicken feed.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยเป็นอย่างดีโดยได้รับความกรุณาจาก ผศ.ดร. กัญญา จิระเจริญรัตน์ ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมทั้ง รศ.ดร.กานต์ สุขสุแพทย์ และ ผศ.ดร. กนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์ ที่ได้กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณอาจารย์ทั้งสามท่านเป็นอย่างสูงและรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของอาจารย์เป็นอย่างยิ่ง

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับสนับสนุนงานวิจัยจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE)

ขอขอบพระคุณอาจารย์สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังทุกๆท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาให้กับข้าพเจ้าขอขอบคุณเพื่อนๆพี่ๆน้องๆสาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรและสาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ประมงคณะเทคโนโลยีการเกษตรสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังทุกๆคนที่ได้ให้คำแนะนำและให้การเอื้อเฟื้อช่วยเหลือและเสียสละเวลาในการช่วยงานวิจัยนี้อีกทั้งเป็นกำลังใจให้กันมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดามารดาและครอบครัวของข้าพเจ้าที่ให้การสนับสนุนในทุกๆเรื่องทั้งด้านทุนทรัพย์และเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าอยู่ตลอดเวลาของการศึกษาและการวิจัยจนสำเร็จบรรลุวัตถุประสงค์

ทิภาภรณ์ งามสง่า

มิถุนายน 2558

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... II

กิตติกรรมประกาศ..... IV

สารบัญ..... V

สารบัญตาราง..... VIII

สารบัญภาพ..... X

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย..... XI

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 ความสำคัญและที่มา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2

1.3 สถานที่ดำเนินงาน..... 2

1.4 ขั้นตอนการวิจัย..... 2

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ..... 2

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 3

2.1 อาหารสัตว์..... 3

2.1.1 ประเภทและชนิดของอาหารสัตว์..... 3

2.1.2 วัตถุดิบอาหารประเภทพลังงาน..... 7

2.1.3 วัตถุดิบอาหารโปรตีนจากพืช..... 9

2.1.4 วัตถุดิบอาหารโปรตีนจากสัตว์..... 10

2.1.5 วัตถุดิบประเภทไวตามินและแร่ธาตุบริสุทธิ์..... 11

2.1.6 วัตถุดิบประเภทสารปรุงแต่ง..... 12

2.2 ระบบการย่อยอาหารสัตว์ปีก..... 15

2.3 องค์ประกอบเยื่อใยของพืชอาหารสัตว์..... 19

2.4 จุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน..... 23

2.4.1 แบคทีเรีย..... 24

2.4.2 โปรโตซัว..... 26

2.4.3 เชื้อรา..... 27

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

2.5 เอนไซม์เซลลูเลสและไวแลนเนส 27

2.6 การใช้เอนไซม์ปรับปรุงการย่อยได้ของโภชนะในสัตว์ปีก 29

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย 33

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี 33

3.1.1 อาหารที่ใช้สำหรับการแยกเชื้อและการเพาะเลี้ยงเชื้อ 33

3.1.2 สารเคมี 33

3.1.3 เครื่องมือ 34

3.2 วิธีการทดลอง 34

3.2.1 แบคทีเรีย 35

3.2.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่จะทดสอบ 35

3.2.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของ crude enzyme 35

3.2.3.1 การเตรียมสารสกัดเอนไซม์ 36

3.2.3.2 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ 36

3.2.3.3 การศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ 36

3.2.3.4 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ 36

3.2.3.5 การวิเคราะห์การย่อยสลายสับสเตรทของเอนไซม์ 36

3.2.4 การเตรียมตัวอย่างวัตถุดิบอาหารสัตว์ 37

3.2.5 การศึกษาการย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์ 38

3.2.5.1 การวิเคราะห์หา NDF 38

3.2.5.2 การวิเคราะห์หา ADF 38

3.2.5.3 การวิเคราะห์หา lignin 39

3.2.6 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีน 39

3.2.7 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 40

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ 42

4.1 สมบัติการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส 42

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

4.1.1 ผลของเวลาที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์..... 42
4.1.2 ผลของค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์..... 43
4.1.3 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์..... 45
4.1.4 ความจำเพาะของเอนไซม์ต่อการย่อยสารตั้งต้น..... 47
4.2 ผลของการย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์..... 48
4.3 ประสิทธิภาพการย่อยอาหารสัตว์..... 50

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง..... 53
เอกสารอ้างอิง..... 55
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ การเตรียมสารละลาย สีย้อม..... 62
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์เอนไซม์..... 68
ประวัติผู้เขียน..... 72

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ชนิดของเยื่อใยในกากมันสำปะหลัง	8
2.2	องค์ประกอบทางเคมีของอาหารสัตว์	10
2.3	ชนิดและประโยชน์ของเอนไซม์ที่ใส่ลงในอาหารสัตว์	14
3.1	สูตรอาหารไก่เนื้อ เบทาโกร 204	37
4.1	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (crude enzyme) เมื่อใช้เวลาที่ต่างกัน	43
4.2	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนส เมื่อบ่มที่ระดับ pH 3.0-10.0	44
4.3	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่บ่มโดยใช้อุณหภูมิ 30-90 °C	46
4.4	ความสามารถของเอนไซม์จากแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P1และ ID2R1P2 ในการย่อยสับสเตรทชนิดต่างๆ	48
4.5	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ย่อยกับวัสดุ 1 กรัม ของแบคทีเรีย ID2R1P1 และ ID2R1P2	49
4.6	ประสิทธิภาพการย่อยอาหารสัตว์ไก่เนื้อเบทาโกร 204 อายุ 3-6 สัปดาห์	51
4.7	สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและคุณสมบัติการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P1 และ ID2R1P2	52

สารบัญตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่		หน้า
ก1	การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ sodium acetate.....	64
ก2	การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ sodium phosphate.....	65
ข1	แสดงค่ามาตรฐานกลูโคสที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์.....	67
ข2	แสดงค่ามาตรฐานไซโลสที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์.....	69
ข3	แสดงค่ามาตรฐาน BSA ของการวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีน.....	70

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	บทบาทของอาหารหยาบและอาหารข้นต่อการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของสัตว์	6
2.2	ระบบทางเดินอาหารของไก่	19
2.3	โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส เซลลูโลสและลิกนิน	21
2.4	การวิเคราะห์โดยวิธี Detergent method	23
2.5	แสดงลักษณะกระเพาะของสัตว์เคี้ยวเอื้อง	24
2.6	ปฏิกิริยาของระบบเอนไซม์เซลลูเลส	28
4.1	ค่าฤทธิ์สัมพันธ์ของเอนไซม์เซลลูเลส ในแต่ละเวลาของการบ่ม	43
4.2	ค่าฤทธิ์สัมพันธ์ของเอนไซม์เซลลูเลส เมื่อบ่มที่ระดับ pH 3.0-10.0	45
4.3	ค่าฤทธิ์สัมพันธ์ของเอนไซม์เซลลูเลสที่บ่มโดยใช้อุณหภูมิ 30-90 °C	47
4.4	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จากแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P1 และ ID2R1P2 ในการย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์	49

ภาพผนวกที่

ข1	กราฟมาตรฐานกลูโคส (Glucose Standard)	68
ข2	กราฟมาตรฐานไซโลส (xylose standard)	69
ข3	กราฟมาตฐานโปรตีน (BSA standard)	70

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

CMC	Carboxymethycellulose
DNS	3,5-Dinitrosalicylic acid
LB	Lubia-Bertani
mg	Milligram
mg/ml	Milligram per milliliter
mM	MilliMolar
M	Molar
ng	Nanogram
µg	Microgram
µg/µl	Microgram per microlite
µg/ml	Microgram per milliliter
µl	Microlite
µM	MicroMolar
µMole	MicroMole
°C	Degree Celsius
%	Percentage
L	Liter
nm	nanometer

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมมีการเลี้ยงสัตว์เป็นอาชีพหลัก ปัจจัยที่สำคัญในการเลี้ยงสัตว์คืออาหาร ประเทศไทยมีวัตถุดิบอาหารสัตว์จำพวกพืชเป็นจำนวนมาก ในการใช้พืชเป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ ก็มักจะมีข้อจำกัดในการใช้คือ ปริมาณการผลิตในประเทศ ราคาและสารพิษ ปัญหาที่สำคัญในการใช้งานของพืช คือ ระบบการย่อยของสัตว์เอง ในระบบอุตสาหกรรมอาหารสัตว์การผลิตอาหารสัตว์กระเพาะเดี่ยว เช่นไก่ สุกร เป็ด จำเป็นจะต้องมีการเสริมเอนไซม์ในกลุ่มไซแลโนไลติกและเซลลูโลไลติก เพื่อช่วยในระบบการย่อยอาหารของสัตว์ย่อยสลายและดูดซึมสารอาหารได้ดีขึ้น เนื่องจากสัตว์เหล่านี้ไม่มีกระเพาะหมักในทางเดินอาหารส่วนต้น จึงไม่มีจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์มาช่วยย่อยอาหาร เอนไซม์ย่อยอาหารที่สัตว์กระเพาะเดี่ยวผลิตได้เองนั้นมีเพียงไม่กี่ชนิด เช่น อะไมเลส (amylase) สำหรับย่อยแป้ง และโปรติเอส (proteases) สำหรับย่อยโปรตีน แต่ในขณะที่วัตถุดิบอาหารสัตว์นั้นมีสารอาหารอื่น เช่น กากถั่วเหลือง รำข้าว และข้าวโพดมีโพลิแซคคาไรด์ที่มีชื่อว่า เบต้า-แมนแนน ไซแลน (xylan) เบต้า-กลูแคน และเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่มาก ผนังเซลล์พืชประกอบไปด้วย เซลลูโลส (cellulose) คือคาร์โบไฮเดรตชนิดที่พบมากที่สุดในเยื่อใยพืช เฮมิเซลลูโลส เพกทิน สารประกอบไขมันและสารอื่นๆที่ช่วยทำให้ผนังเซลล์สามารถยืดหยุ่นได้และมีความแข็งแรง (ชวนพิศ แดงสวัสดิ์. 2544) จึงเห็นความสำคัญของการทำวิจัยเพื่อนำไปสู่การผลิตเอนไซม์ขึ้นใช้เองภายในประเทศ โดยนำมาจากแหล่งธรรมชาติ ในกระเพาะหมักของกระบือซึ่งเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์ มีความสามารถในการย่อยเยื่อใยของพืชอาหารหยาบที่กระบือกินเข้าไป จึงได้นำเชื้อไอโซเลท ID2R1P1 และ ID2R1P2 ซึ่งได้คัดแยกจากงานวิจัยของมานิสา บุพตา (2555) พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* ถึง 98 % ซึ่งแบคทีเรียไอโซเลทนี้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดี

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อผลิตเอนไซม์มากที่สุดโดยการใช้วัตถุดิบพืชอาหารสัตว์เป็นแหล่งคาร์บอน การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์รวมทั้งความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ นอกจากนี้ยังต้องการที่จะศึกษาความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตอาหารสัตว์เพื่อใช้เป็นแนวทางในการนำเอนไซม์ไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อประเมินสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อการผลิตเอนไซม์
2. เพื่อประเมินสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ที่สกัดได้
3. เพื่อประเมินความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์

1.3 สถานที่ดำเนินงาน

ห้องปฏิบัติการโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

1.4 ขั้นตอนการวิจัย

แบ่งได้เป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่จะทดสอบ
2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรีย
3. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส
4. การศึกษาการย่อยของอาหารไก่สำเร็จรูปและการวิเคราะห์การย่อยเยื่อใย

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์

2.ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์

3.ทราบความสามารถในการย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์ของเอนไซม์ได้

บทที่2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อาหารสัตว์

อาหารสัตว์ (Feedstuff) หมายถึง สารใดๆก็ตามไม่ว่าจะได้จากแหล่งธรรมชาติหรือสังเคราะห์ขึ้นตามกระบวนการทางเคมี หรือชีวภาพ ซึ่งมีคุณค่าทางด้านโภชนศาสตร์ในแง่ของการให้โภชนะและทำให้เกิดประโยชน์อย่างใดอย่างหนึ่งแก่สัตว์เมื่อสัตว์กินสารนั้นเข้าไปและสารนั้นจะต้องไม่เป็นอันตรายแก่สัตว์ (สาโรช ค้าเจริญ. 2542)

อาหารสัตว์ หมายถึง วัตถุใดๆที่สัตว์กินได้ แล้วนำมาผสมส่วนหนึ่งในอาหารที่สัตว์กินทุกๆวัน (Cullison. 1979)

อาหารสัตว์ (Feedstuff) หมายถึง สารที่เหมาะสมสำหรับเป็นอาหารสัตว์ซึ่งอาหารหลายๆชนิดได้นำมารวมกัน เพื่อให้ได้คุณค่าทางอาหารครบถ้วน (Church and Pond. 1982)

2.1.1 ประเภทและชนิดของอาหารสัตว์

การใช้อาหารของสัตว์ หมายถึง สัตว์ที่นำอาหารเข้าสู่ร่างกายเพื่อเพิ่มน้ำหนักตัวซึ่งเกิดจากการที่อวัยวะส่วนต่าง ๆ มีการขยายขนาดของเซลล์หรือเพิ่มปริมาณเซลล์ให้มากขึ้นและการที่จะขยายขนาดหรือเพิ่มปริมาณเซลล์ได้ต้องอาศัยสารอาหารต่าง ๆ มาสร้างขึ้น และสารอาหารเหล่านี้มีอยู่ในสิ่งที่สัตว์กินเข้าไป ซึ่งเรียกว่า อาหาร (feeds) ที่นำมาใช้เลี้ยงสัตว์มีมากมายหลายชนิดซึ่งมีบทบาทต่อการดำรงชีพ การเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของสัตว์ในแต่ละช่วงอายุของสัตว์ เพื่อให้ร่างกายสัตว์ดำเนินกิจกรรมต่าง ๆ เป็นไปอย่างปกติ (ธาตรี จีราพันธุ์.2549)

เสาวนิต คูประเสริฐ (2527) กล่าวว่า การแบ่งประเภทอาหารของสัตว์อาจแบ่งเป็นประเภทใหญ่ๆได้ 2 ประเภท คือ อาหารข้น (concentrates) และอาหารหยาบ (roughages)

2.1.1.1 อาหารหยาบ (roughage) คือ วัตถุดิบอาหารสัตว์หรืออาหารสัตว์ที่มีลักษณะฟ่าม (bulky) มีปริมาตรสูงแต่น้ำหนักต่ำ มีปริมาณเยื่อใย (crude fiber) สูงกว่า 18 % และ มีโภชนะที่ย่อยได้ต่ำ เนื่องจากมีส่วนของผนังเซลล์ที่มีเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน หรือซิลิก้าเป็นส่วนประกอบ ได้แก่ หญ้าและถั่วชนิดต่างๆ ต้นข้าวโพด ฟางข้าว หญ้าแห้ง หญ้าหมัก เศษเหลือจากการเกษตรและโรงงานอุตสาหกรรมเกษตร (บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2541)แบ่งเป็น

2.1.1.1.1 อาหารหยาบสด หมายถึง พืชตระกูลหญ้าและพืชตระกูลถั่วที่ให้สัตว์แทะเล็มกินสดหรือตัดสดมาให้กิน เช่น หญ้าขน หญ้ากินนี เนเปียร์ หญ้าพื้นเมือง ต้นและใบ กิ่ง

สด ตลอดจนวัสดุพลอยได้ทางการเกษตรและโรงงาน เช่น ต้นและเปลือกข้าวโพด เปลือกสับปะรด ยอดอ้อย ชานอ้อย เป็นต้น

2.1.1.1.2 อาหารหยาบแห้ง หมายถึง พืชตระกูลหญ้าและพืชตระกูลถั่วที่ระเหยน้ำออกไปให้เหลืออยู่ในระดับ 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งยังคงคุณค่าทางอาหารและเก็บรักษาได้ในช่วงฤดูขาดแคลน ได้แก่ หญ้าแห้ง ต้นและใบถั่วแห้ง ใบมันสำปะหลังแห้ง เป็นต้น

2.1.1.1.3 อาหารหยาบหมัก หมายถึง พืชอาหารสัตว์ทั้งตระกูลหญ้าและถั่วสดๆ ที่มีสภาพลำต้นอวบน้ำ นำมาอัดรวมกันในภาชนะที่ไม่มีอากาศ ซึ่งพืชหมักจะยังคงสภาพอวบน้ำและคุณค่าทางอาหารใกล้เคียงกับหญ้าสด สามารถเก็บไว้ใช้ในฤดูขาดแคลน เช่น หญ้าหมัก ต้นข้าวโพดหมัก (ธาตรี จีราพันธุ์.2549) เป็นต้น

2.1.1.2 อาหารข้น (concentrate) หมายถึงวัตถุดิบอาหารสัตว์หรืออาหารสัตว์ที่มีเยื่อใยน้อยกว่า 18 % หรือไม่เกิน 18 % และมีโภชนะที่ย่อยได้สูง ได้แก่วัตถุดิบอาหารสัตว์ที่เป็นแหล่งพลังงาน วัตถุดิบอาหารสัตว์ที่เป็นแหล่งโปรตีน วัตถุดิบอาหารสัตว์ที่เป็นแหล่งเสริมแร่ธาตุหรือไวตามิน และวัตถุดิบอาหารเสริมต่างๆที่ไม่ใช่อาหารสัตว์หรือไม่ให้โภชนะแก่สัตว์โดยตรง แบ่งออกเป็น 6 ชนิด คือ (ธาตรี จีราพันธุ์.2549)

2.1.1.2.1 โปรตีน โปรตีน คือ สารประกอบเชิงซ้อนของอินทรีย์สาร เราจะพบโปรตีนในเซลล์ที่มีชีวิตทุกเซลล์ หรือในสารประกอบพวก biological fluid เช่น blood plasma เป็นส่วนประกอบสำคัญมากของร่างกาย (พันทิพา พงษ์เพียจันทร์.2543)โปรตีนประกอบด้วยโปรตีนแท้และสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน เช่น เกลือแอมโมเนียม amind กรดอะมิโนอิสระ เป็นต้น โปรตีนเป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อต่างๆ ในร่างกายเช่น กล้ามเนื้อ กระดูก หนัง ขน เป็นโครงสร้างของกลไกสำคัญในการดำรงชีพทำหน้าที่เป็นภูมิคุ้มกัน ช่วยรักษาสมดุลของเหลวภายในและภายนอกเซลล์

2.1.1.2.2 คาร์โบไฮเดรต เป็นสารประกอบทางเคมีที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติ ส่วนใหญ่จะประกอบอยู่ในเนื้อเยื่อของพืช พวกพืชอาหารสัตว์จะประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตถึง 50% ของวัตถุแห้ง ส่วนในอาหารข้น เช่นพวกเมล็ดธัญพืช พบว่ามีคาร์โบไฮเดรตประกอบอยู่ถึง 80% ส่วนในสัตว์จะมีคาร์โบไฮเดรตอยู่น้อย ในรูปของไกลโคเจน เก็บสะสมที่ตับ และแทรกอยู่ตามกล้ามเนื้อ ใช้เป็นแหล่งพลังงาน แต่พลังงานในสัตว์ส่วนใหญ่จะเก็บไว้ในรูปของไขมัน (พันทิพา พงษ์เพียจันทร์.2543) และเป็นแหล่งของพลังงานที่สำคัญในร่างกาย เพราะอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบในสูตรอาหารสัตว์ เราจึงถือว่าเป็นอาหารหลัก อาหารคาร์โบไฮเดรตแบ่งออกเป็น 2 พวก คือ น้ำตาลและแป้ง กับ เยื่อใย แป้งและน้ำตาลเป็นส่วนที่ละลายง่ายและย่อยง่าย อาหารสัตว์ที่มีคาร์โบไฮเดรตชนิดนี้สูง ได้แก่ เมล็ดธัญพืช เช่น ข้าว ข้าวโพด เยื่อใยเป็นส่วนที่อยู่ในต้นและใบ สัตว์กระเพาะเดี่ยวไม่สามารถย่อยสารเยื่อใยเหล่านี้ได้ (อาวุธ ตันโช. 2538)

2.1.1.2.3 ไขมัน เป็นสารอินทรีย์ที่ประกอบด้วยธาตุหลัก คือ คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน สัตว์มีความสามารถเก็บสำรองพลังงานที่ได้รับมากเกินพอในรูปของไขมัน (จรัส สว่างทัพ. 2548) ไขมันยังเป็นแหล่งอาหารพลังงานที่สำคัญของอาหารไก่ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันโดยเฉพาะในไก่เนื้อเพราะไขมันให้พลังงานที่ใช้ได้ นอกจากนี้ไขมันยังช่วยลดฝุ่นในอาหารขณะทำการผสมและยังช่วยให้อาหารมีรสชาติและสีสันน่ากินอีกด้วย การผสมไขมันในอาหารสามารถผสมได้ในปริมาณที่จำกัด 3-5 % ไขมันที่ใช้ผสมอาหารมี 2 ชนิดด้วยกันคือ ไขมันที่ได้จากสัตว์และไขมันที่ได้จากพืช(ปฐม เลาหะเกษตร.2540)

2.1.1.2.4 ไวตามิน เป็นสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างซับซ้อน สัตว์ต้องการในปริมาณน้อย แต่มีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการดำรงชีพ การเจริญเติบโตและการสืบพันธ์ เพราะจำเป็นต่อปฏิกิริยาเคมีต่อร่างกาย (จรัส สว่างทัพ. 2548) จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการดำรงชีวิตของไก่ ช่วยสร้างความแข็งแรงและความกระปรี้กระเปร่าแก่ร่างกาย สร้างความต้านทานโรค และบำรุงระบบประสาท แต่ร่างกายต้องการในปริมาณน้อย แต่ขาดไม่ได้ เพื่อให้ปฏิกิริยาต่าง ๆ ในร่างกายดำเนินไปตามปกติ วิตามินแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามคุณสมบัติในการละลาย คือ วิตามินที่ละลายในไขมัน ได้แก่ วิตามิน เอ ดี อี เค และวิตามินที่ละลายในน้ำ ได้แก่ วิตามินบี ซี หากไก่ขาดจะทำให้โตช้าและเป็นโรคขาดวิตามินนั้น ๆ (ไสว นามคุณ, 2555)

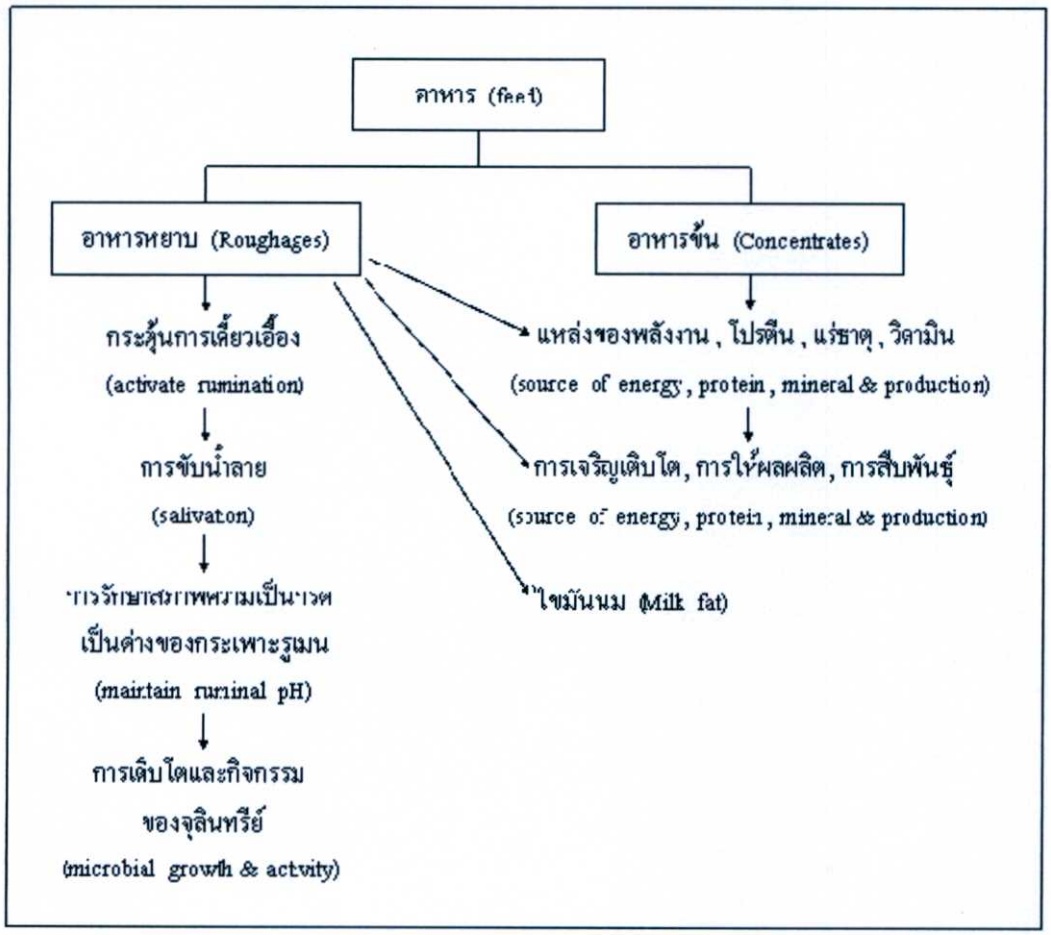
2.1.1.2.5 แร่ธาตุ เป็นอนินทรีย์สารที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในเนื้อเยื่อของสัตว์ ซึ่งพบว่ามีอยู่มาก 30-40 ชนิด แร่ธาตุที่มีบทบาทในกระบวนการเมแทบอลิซึม จัดเป็นแร่ธาตุที่จำเป็น พบว่ามีอยู่ 22 ชนิด ส่วนแร่ธาตุที่เข้ามาอยู่ในเนื้อเยื่อของสัตว์เนื่องจากเป็นส่วนประกอบของอาหารที่สัตว์กินโดยไม่ได้มีบทบาทในกระบวนการเมแทบอลิซึมของสัตว์จัดเป็นแร่ธาตุที่ไม่จำเป็น (จรัส สว่างทัพ. 2548) แร่ธาตุช่วยในการสร้างโครงกระดูก สร้างความเจริญเติบโต สร้างเลือด สร้างเปลือกไข่ และอื่น ๆ ร่างกายสัตว์มีแร่ธาตุเป็นส่วนประกอบอยู่ประมาณ 3% ของน้ำหนักตัว แร่ธาตุที่สำคัญได้แก่ แคลเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม โซเดียม คลอรีน เหล็ก กำมะถัน ไอโอดีน ทองแดง โคบอลต์ แมงกานีส และสังกะสี (ไสว นามคุณ, 2555)

2.1.1.2.6 น้ำ เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของร่างกาย น้ำเป็นส่วนประกอบของเซลล์โดยเฉพาะในร่างกายสัตว์อ่อนจะมีน้ำเป็นส่วนประกอบอยู่มากกว่าสัตว์โตเต็มวัย สัตว์ที่ขาดน้ำ 5-10% ของปริมาณน้ำที่มีอยู่ในร่างกายจะแสดงอาการผิดปกติ(จรัส สว่างทัพ. 2548) ร่างกายไก่มีน้ำเป็นส่วนประกอบประมาณ 60-70% ลูกไก่อายุ 1 วัน มีน้ำเป็นองค์ประกอบ 85% และจะลดลงเมื่ออายุมากขึ้น น้ำมีหน้าที่สำคัญต่อร่างกาย เช่น ช่วยในการย่อย การดูดซึม การรักษาระดับความร้อนปกติในร่างกาย และช่วยในการขับถ่ายของเสียออกนอกร่างกาย น้ำนับเป็นสารอาหารที่จำเป็นและมีความสำคัญที่สุด เพราะถ้าไก่ขาดน้ำจะทำให้ไก่ไม่อยากกินอาหารและอาจถึงตายได้ ดังนั้นเกษตรกรจะต้องหาภาชนะใส่น้ำจืดสะอาดตั้งไว้ให้ไก่กินตลอดเวลา หากไก่ขาดน้ำจะแคระแกร็น และการสูญเสียน้ำเพียง 10% ของร่างกาย ไก่จะตายได้ (ไสว นามคุณ, 2555)

2.1.1.2.7 วัตถุเติมแต่ง สารเติมพิเศษ เป็นสารที่มีคุณลักษณะเฉพาะที่ใช้เติมลงในอาหารสัตว์ โดยไม่ได้โภชนะแก่สัตว์โดยตรง แต่ใช้เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการใช้อาหารเพิ่มความน่ากิน กระตุ้นให้สัตว์ย่อยอาหารดีขึ้น ป้องกันและลดอันตรายจากเชื้อโรคในอาหาร เช่น ยาปฏิชีวนะ ฮอร์โมน เอนไซม์ สารสี สารกันหืน สารอัดเม็ด กรดผสมอาหารสัตว์ และจุลินทรีย์ผสมอาหารสัตว์ เป็นต้น เช่นยาปฏิชีวนะ ฮอร์โมน สารกันหืน เป็นต้น (สุวรรณ เกษตรสุวรรณ. 2535)

2.1.1.3 อาหารสำเร็จ (Complete Feed) คืออาหารที่มีโภชนะครบถ้วนตามความต้องการของสัตว์เฉพาะอย่าง เมื่อสัตว์กินเข้าไปในปริมาณที่เพียงพอแล้วจะสามารถเติบโต ดำรงชีพ และให้ผลผลิตโดยไม่ต้องให้อาหารอื่นอีก นอกจากน้ำเท่านั้น (จรัส สว่างทัพ. 2548)

2.1.1.4 อาหารเสริม คือ วัตถุดิบที่ที่มีคุณค่าทางอาหารเฉพาะอย่างที่จะผสมกับอาหารหลักเป็นอาหารใช้เลี้ยงสัตว์



ภาพที่ 2.1 บทบาทของอาหารหยาบและอาหารข้นต่อการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของสัตว์ (บุญล้อม ชีวอิสระกุล. 2542)

2.1.2 วัตถุดิบอาหารประเภทพลังงาน

2.1.2.1 ปลายข้าว (อุทัย คันโธ.2529) กล่าวว่า เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ใช้เลี้ยงสุกรมาตั้งแต่ดั้งเดิมและปัจจุบันก็ยังใช้เลี้ยงอยู่ทั่วไป ทั้งนี้เพราะเป็นวัตถุดิบอาหารที่หาได้ง่าย แม้กระทั่งในท้องถิ่นที่ห่างไกล อีกทั้งบางขณะมีราคาค่อนข้างถูก เมื่อเทียบกับวัตถุดิบอาหารอื่นๆ ที่มีคุณค่าทางอาหารใกล้เคียง เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง นอกจากนี้ปลายข้าวหรือรำละเอียดที่ซื้อมามักจะอยู่ในรูปที่สามารถใช้ผสมอาหารได้เลยไม่ต้องมาบดให้ละเอียดอย่างเช่น ข้าวโพด หรือข้าวฟ่าง

ปลายข้าวเป็นผลพลอยได้จากการสีข้าว ปลายข้าวเป็นวัตถุดิบที่เหมาะแก่การเลี้ยงสัตว์โดยเฉพาะสุกรมากที่สุดก็ว่าได้ทั้งนี้เพราะปลายข้าวประกอบไปด้วยแป้งที่ย่อยง่ายเป็นส่วนใหญ่ มีไขมันละเยื่อใยในระดับต่ำ ปลายข้าวจึงสามารถเก็บไว้ได้นานโดยไม่เหม็นหืน ปลายข้าวมีสีขาว สามารถตรวจสอบการปลอมปนได้ง่าย ปลายข้าวที่ใช้เลี้ยงไก่และสุกรควรเป็นปลายข้าวเม็ดเล็ก หากเป็นปลายข้าวเม็ดใหญ่ สัตว์จะไม่สามารถย่อยได้หมด จึงควรนำมาบดเสียก่อนจะใช้ผสมอาหาร

ปลายข้าว กล่าวว่า ปลายข้าวประกอบไปด้วยเศษของเมล็ดที่หักและจมูกข้าว ซึ่งเป็นส่วนของต้นอ่อน ส่วนนี้มีโปรตีน ไขมันและวิตามิน และแร่ธาตุมากกว่าส่วนอื่นๆของเมล็ดข้าว ปลายข้าวมี 3 ชนิด คือ ปลายข้าวเจ้า ปลายข้าวเหนียว และปลายข้าวนึ่ง (ภรณี ต่างวิวัฒน์และคณะ. 2553)

ลักษณะทางโภชนะที่สำคัญ

ให้พลังงานสูง เช่น ให้พลังงานใช้ประโยชน์ได้ 3490 กิโลแคลอรี/กิโลกรัม ในสุกรมีโปรตีนต่ำ (ประมาณร้อยละ 8) ซึ่งใกล้เคียงกับข้าวโพด แต่ปลายข้าวมีกรดอะมิโนไลซีนสูงกว่าข้าวโพดมีไขมันต่ำ (ประมาณร้อยละ 0.9) จึงเก็บได้นานโดยไม่เหม็นหืน มีเยื่อใยต่ำ (ประมาณร้อยละ 1)

2.1.2.2 รำหยาบ (rice bran หรือ rice meal) กล่าวว่า รำหยาบประกอบไปด้วยแกลบซึ่งเป็นเปลือกชั้นนอกสุดปนมาบ้าง (แต่ละเอียดกว่าแกลบจริง) มีคุณค่าทางอาหารสัตว์ คือ โปรตีนรวมประมาณ 11-13 เปอร์เซ็นต์ มีเยื่อใยไม่เกิน 13 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 10-15 เปอร์เซ็นต์เมื่อสีออกมาใหม่ๆจะมีความน่ากินสูงมาก แต่ทิ้งไว้นานๆจะมีกลิ่นหืน เพราะเป็นอาหารที่มีไขมันสูง รำ

มีโปรตีนสูงกว่าข้าวโพด มีฟอสฟอรัส ไนอะซีน และวิตามินบี 1 สูงเป็นพิเศษ และมี บี 2 มากกว่าข้าวทั้งเมล็ด (พันทิพา พงษ์เพียจันทร์. 2547)

2.1.2.3 มันสำปะหลัง (cassava) เป็นส่วนของหัวมันสำปะหลังสดที่นำมาสับเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วตากให้แห้ง การตากแห้งจะเป็นการลดความเป็นพิษของมันสำปะหลังวิธีหนึ่ง เนื่องจากในหัวมันสดจะมีสารพิษพวก cyanogenic glucosides เช่น linamarin และ lotaustralin ซึ่งสารพิษทั้ง 2 ชนิดนี้เมื่อถูกเปลี่ยนเป็นกรดไฮโดรไซยานิก (hydrocyanic acid หรือ prussic acid) จะเป็นพิษที่สามารถทำให้สัตว์ถึงตายได้ มันเส้นนับเป็นแหล่งพลังงานที่มีราคาถูก ในการเลือกซื้อมันเส้นเพื่อเป็นอาหารโค จึงควรสังเกตุการปนปลอมจากเชื้อรา ทราย กิ่ง และลำต้นแห้ง เพราะมันเส้นที่มีการปนปลอมมากคุณค่าทางอาหารจะต่ำลงอีก มันเส้นที่ใช้เป็นอาหารโคไม่ควรนำไปบดหรือป่นเช่นเดียวกับในอาหารสุกร เนื่องจากอาหารจะมีลักษณะเป็นฝุ่นมาก ผลิตภัณฑ์จากมันสำปะหลังที่นำมาใช้เป็นอาหารสัตว์นอกจากมันเส้น สามารถใช้มันอัดเม็ดได้เช่นกัน แต่ราคาอาหารจะสูงขึ้นด้วย มันเส้นแม้ว่าจะเป็นแหล่งพลังงานที่มีราคาถูก แต่ในภาคเหนือก็หาซื้อได้ยากเช่นกัน แหล่งที่สามารถหาซื้อได้คือจังหวัดเชียงราย น่าน กำแพงเพชร เป็นต้น Suksombat *et al.* (2006) พบว่ากากมันสำปะหลังมีสัดส่วนของเฮมิเซลลูโลส 27.8%สูงกว่าเซลลูโลส 5.9%แต่ Rattanachomsri *et al.* (2009) กล่าวว่ากากมันสำปะหลังมีสัดส่วนของเซลลูโลสสูงกว่าเฮมิเซลลูโลส อาจมีปัจจัยมาจากลักษณะสายพันธุ์ อายุและคุณภาพของหัวมัน สภาพดินที่ปลูก วิธีการเก็บและกระบวนการสกัดดังตาราง 2.1

ตารางที่ 2.1ชนิดของเยื่อใยในกากมันสำปะหลัง (Dry matter)

References	Fiber	Cellulose	Hemicellulose	Lignin
Rattanachomsri *et al.* (2009)	23	15.6	4.6	2.8
Ali *et al.* (2011)	20.1	8.1	2.8	2.2
Khempaka *et al.* (2009)	13.6	-	-	-
Suksombat *et al.* (2006)	6.6	5.9	27.8	3.9
Thongchat Suriyawong (2013)	9.2	3.3	10.2	11.4

ที่มา : ดัดแปลงจากธงชาติ สุริยวงค์ (2556)

2.1.2.4 ข้าวโพดบด (maize หรือ corn meal) เป็นแหล่งพลังงานที่สามารถหาซื้อได้ง่ายในภาคเหนือเช่นกัน ข้าวโพดยังเป็นแหล่งของไวตามินเอ ที่สำคัญ เนื่องจากมีไวตามินเอ (provitamin A) ที่สามารถเปลี่ยนเป็นไวตามินเอได้เมื่อเข้าสู่ระบบทางเดินอาหาร ในการใช้ข้าวโพดในอาหารโค ไม่ควรใช้ในรูปเมล็ดข้าวโพด เนื่องจากย่อยยาก และแป้งข้าวโพดมีการ

สลายตัวต่ำในกระเพาะรูเมน จึงควรนำมาบดก่อนที่จะนำมาใช้ แป้งข้าวโพดจะถูกย่อยได้ดีในส่วนของลำไส้เล็ก ซึ่งสัตว์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้โดยตรง ข้าวโพดจึงเป็นแหล่งพลังงานที่ดีสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้องที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตและให้ผลผลิต

2.1.3. วัตถุดิบอาหารโปรตีนจากพืช

2.1.3.1 กากถั่วเหลือง (พันทิพา พงษ์เพียจันทร์. 2547) กล่าวว่า เป็นแหล่งโปรตีนจากพืชที่มีคุณภาพสูงสุดมี EAA หลายตัวแต่มี cystineและ methionine มีน้อยมาก เม็ดถั่วเหลืองมีโปรตีนประมาณ 38 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 16-21 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อสกัดเอาน้ำมันออกแล้วจะมีโปรตีนเฉลี่ย 44 เปอร์เซ็นต์ อาจสูงถึง 50 เปอร์เซนต์ ขึ้นอยู่กับวิธีสกัดน้ำมันและขนาดของเมล็ด แบ่งทางการค้าได้ 2 เกรด คือ กากถั่วเหลือง 44 เปอร์เซ็นต์ และ49 เปอร์เซ็นต์ ถ้าเป็นกากถั่วเหลือง 44 เปอร์เซ็นต์ คือกากถั่วเหลืองที่มีเปลือกผสมอยู่ส่วน 49 เปอร์เซ็นต์ คือ กากถั่วเหลืองที่กระเทาะเอาเปลือกออก ไม่มีส่วนของเปลือกปนมาเลยเป็นเนื้อในของถั่วเหลืองแท้ๆ โปรตีนอาจสูงถึง 51-52 เปอร์เซ็นต์ ถั่วเหลืองดิบมีสารพิษอยู่มากมีทั้งสารที่เป็นตัวกระตุ้นแก่งแย่ง รวมทั้งสารที่ทำให้เกิดการแพ้บวม และที่สำคัญคือ trypsin inhibitor ดังนั้น ในกรณีของถั่วเหลืองจึงพบว่าถั่วเหลืองที่โดนความร้อนจะมีคุณค่าของโภชนะสูงกว่าถั่วดิบ แต่หากความร้อนสูงเกินไปจะทำให้คุณค่าของโภชนะเสียได้ กากถั่วเหลืองยังมีคุณสมบัติในการระบายท้องและทำให้ซากสัตว์มีไขมันเหลว (ภรณี ต่างวิวัฒน์ และคณะ. 2553)

2.1.3.2 กากมะพร้าว (coconut meal) กากมะพร้าวเป็นแหล่งโปรตีนและพลังงานที่สัตว์เคี้ยวเอื้องสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ดี แม้ว่าจะมีกรดอะมิโนไลซีน (lysine) และฮีสทีดีน (histidine) ต่ำ แต่มีข้อเสียคือ มีไขมันสูง ทำให้เกิดการเหม็นหืนได้ง่าย จึงเก็บรักษาไว้ไม่ได้นาน

2.1.3.3 กากถั่วลิสง (peanut meal) เป็นแหล่งโปรตีนที่ได้จากการสกัดน้ำมัน ที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง เนื่องจากมีราคาถูกกว่ากากถั่วเหลืองมาก แต่มีข้อเสียในด้านคุณภาพ ทั้งที่เกิดจากการปนปลอมจากเปลือกฝักขณะทำการอัดน้ำมัน หรือสกัดน้ำมัน ซึ่งมีผลให้โปรตีนลดลง หรือเกิดจากขบวนการผลิตที่ไม่มีคุณภาพแล้ว ปัญหาที่มักพบก็คือการเหม็นหืน การมีเชื้อรา และการมีสารพิษพวกอัลฟ่าทอกซิน (alfatoxin)เป็นต้น กากถั่วลิสงไม่นิยมใช้เป็นส่วนผสมในสูตรอาหารข้นลูกโค เนื่องจากความสมดุลของกรดอะมิโนมีน้อยกว่ากากถั่วเหลือง

2.1.3.4 กากเมล็ดฝ้าย (cottonseed meal) เป็นแหล่งโปรตีนจากพืชที่สำคัญอย่างหนึ่ง แต่ไม่นิยมใช้ในอาหารลูกโค เนื่องจากขาดกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย เช่น เมทไธโอนีน (methionine) ไลซีน (lysine) และซีสทีน (cystine) นอกจากนี้ยังมีแคลเซียมต่ำ กากเมล็ดฝ้ายอาจมีสารพิษคือ กอสซิปอล (gossypol) หลงเหลืออยู่ได้ แต่ส่วนใหญ่จะไม่เป็นพิษในสัตว์เคี้ยวเอื้อง

วัตถุดิบอาหารสัตว์ชนิดต่าง ๆ เมื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใยประเภทต่าง ๆ พบว่าในวัตถุดิบอาหารสัตว์ ได้แก่ ธัญพืช พืชหัว กากพืชน้ำมัน และปลาป่นจะมีเยื่อใยหยาบ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในปริมาณที่ต่ำ ในส่วนของวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่มีเปลือกอยู่ด้วย ได้แก่ รำกาก เมล็ดฝ้าย กากเมล็ดนุ่น และกากมันสำปะหลังจะมีเยื่อใยสูงขึ้น ในส่วนของอาหารหยาบ เช่น หญ้าสด หญ้าแห้ง ฟางข้าว ต้นและใบของพืชต่าง ๆ มีเยื่อใยอยู่สูงและจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อพืชมีอายุมากขึ้น ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบทางเคมีของอาหารสัตว์

Ingredients	Crude fiber	NFE	Cellulose	Hemicellulose	Lignin
มันเส้น	3.6	88.84	-	-	-
กากมันสำปะหลัง[1]	20.1	65.6	8.1	2.8	2.2
ข้าวโพด	2.6	81.5	2	6	1
กากถั่วเหลือง	7	37.3	10	-	-
รำข้าวเจ้า	12.8	45.2	18	15	-
กากถั่วลิสง	10.8	29.2	-	-	-
กากนุ่น	24.8	43.5	-	-	-
กากฝ้าย	12.8	31.3	20	8	6
ปลาป่น	1	1	-	-	-

หมายเหตุ: NFE = Nitrogen free extract เป็นคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้ง่ายคือ แป้งและน้ำตาล

ที่มา: บุญล้อม ชีวอิสระกุล (2541) และ NRC (1998)

กากมันสำปะหลัง[1] คือ Djuma *et al.* (2011) เป็นกากมันจากกระบวนการผลิตเอทานอล

2.1.4. วัตถุดิบอาหารโปรตีนจากสัตว์ อุทัย คันโธ (2529) กล่าวว่า

2.1.4.1 ปลาป่น เป็นวัตถุดิบอาหารที่ให้โปรตีนสูงทั้งด้านปริมาณและคุณภาพ จึงเหมาะแก่การเจริญเติบโตของสุกรมาก ปลาป่นที่ผลิตในไทยมิได้ทำจากปลาชนิดใดชนิดหนึ่งโดยเฉพาะ โดยทั่วไปมักทำจากเศษปลาหรือปลาเป็ดซึ่งไม่สามารถใช้เป็นอาหารคนได้ ปลาป่น

แท้ๆจะมีโปรตีนระหว่าง 50-65 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ปลาป่นยังประกอบไปด้วยแร่ธาตุในปริมาณสูงถึง 20- 24 เปอร์เซ็นต์

ปลาป่นในประเทศไทยในอดีตแบ่งตามคุณภาพ ได้ดังนี้ (พันทิพา พงษ์เพียจันทร์. 2547)

1. ปลาป่นเค็ม การนำเอาปลาตัวเล็กๆ ดิบๆ มาใส่เกลือตากแห้งแล้วป่น มีโปรตีน 40-43 เปอร์เซ็นต์มีเกลือ 8-15 เปอร์เซ็นต์ มีคุณค่าทางอาหารต่อสัตว์กระเพาะเดี่ยวเลวกว่าปลาป่นชนิดอื่นๆ เนื่องจากเกิดการหืนในเนื้อปลา ทำให้มีกลิ่นเหม็นหืนชนิดนี้ราคาถูก

2. ปลาป่นกร่อย ลักษณะคล้ายปลาป่นเค็ม เป็นปลาดิบเช่นกันต่างกันที่ปลาป่นกร่อยทำโดยเอาปลาแช่น้ำทะเลหรือน้ำเกลือแล้วตากแห้ง มีโปรตีน 45-48 เปอร์เซ็นต์เกลือ 3-4 เปอร์เซ็นต์ปลาที่ใช้โตกว่าปลาชนิดแรกเล็กน้อย แต่การหืนของไขมันยังมีอยู่ ตรวจสอบความแตกต่างของปลาทั้งสองได้โดยการชิม

3. ปลาป่นจืด ใช้ปลาตัวใหญ่กว่าต้มให้สุกแล้วนำมาตากให้แห้ง มีคุณค่าทางอาหารสูงพอใช้โปรตีน 50-55 เปอร์เซ็นต์ไม่มีเกลือผสมอยู่ เกิดการหืนได้เพราะยังมีไขมันอยู่ แต่เกิดช้ากว่า 2 ชนิดดังกล่าว

4. ปลาป่นจืดอัดน้ำมัน ทำโดยเอาปลาตัวใหญ่มาต้มหรือนึ่งด้วยความดันไอน้ำแล้วอัดเอาของเหลวซึ่งมีไขมันปนอยู่ออก จะได้ปลาป่นและของเหลวซึ่งมีน้ำปนกับไขมันเรียกว่าน้ำคาวปลา ซึ่งมีโปรตีนอยู่ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ ของวัตถุแห้ง ส่วนปลาป่นที่ได้มีโปรตีน 56-60 เปอร์เซ็นต์

2.1.5. วัตถุดิบอาหารประเภทไวตามินและแร่ธาตุบริสุทธิ์

2.1.5.1เปลือกหอยป่น เปลือกหอยป่น เป็นแหล่งของแคลเซียม มีแคลเซียมอยู่ไม่น้อยกว่า 33 เปอร์เซ็นต์ นิยมใช้มากในไก่ มีทั้งเปลือกหอยนางรม หอยกาบ เพราะเปลือกหอยมีขนาดใหญ่กว่าแหล่งของแคลเซียมอื่นๆ ทำให้อยู่ในทางเดินอาหารตรงส่วนกึ๋นนานตลอดคืน และค่อยๆปลดปล่อย แคลเซียม ออกมาสร้างเปลือกไข่ได้สม่ำเสมอ ดังนั้นจึงนิยมใช้เปลือกหอยไปแทนที่หินปูนป่น (พันทิพา พงษ์เพียจันทร์. 2547)

เปลือกหอยบดที่ขายตามท้องตลาดมักจะมีหินฝุ่นปนมาด้วยในปริมาณที่มากน้อยไม่เท่ากัน หากเปลือกหอยที่ใช้ผสมอาหารมีการปนปลอมด้วยหินฝุ่นในระดับสูง ก็จะมีผลทำให้ไข่มีลักษณะเปลือกบางหรือไข่นิ่มและแม่ไก่เป็นง่อยได้ (อุทัย คันโธ. 2529)

วัตถุดิบอาหารสัตว์ชนิดต่าง ๆ เมื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใยประเภทต่าง ๆ พบว่าในวัตถุดิบอาหารสัตว์ ได้แก่ ธัญพืช พืชหัว กากพืชน้ำมัน และปลาป่นจะมีเยื่อใยหยาบเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในปริมาณที่ต่ำ ในส่วนของวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่มีเปลือกอยู่ด้วยได้แก่ รำ กากเมล็ดฝ้าย กากเมล็ดนุ่น และกากมันสำปะหลังจะมีเยื่อใยสูงขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 2.2

2.1.6 วัตถุดิบประเภทของสารปรุงแต่ง

2.1.6.1 สารสี (ภรณี ต่างวิวัฒน์และคณะ.2553) กล่าวว่า สารสีนั้นไม่มีคุณค่าทางอาหารใดๆโดยปกติใส่เพื่อเพิ่มมูลค่าให้ผลผลิต เช่นทำให้ไข่แดงมีสีแดงขึ้น หรือทำให้หนังไก่มีสีเหลืองขึ้น เพื่อผลผลิตทางการตลาดหรือสนองความต้องการของผู้บริโภค สินค้าเหล่านี้มักอยู่ในกลุ่มแซนโธฟีลล์ หรือแคโรทีนอยด์ สารสีแบ่งได้ 2 กลุ่ม คือ

1 สารสีที่ได้จากธรรมชาติ ชนิดของสารสีจากธรรมชาติซึ่งอยู่ในกลุ่มแคโรทีนอยด์โดยมากมักจะมีสีเหลือง ส้ม และแดง ส่วนสารสีจากธรรมชาติที่นำมาใช้เลี้ยงสัตว์คือ สารสีเหลืองจากข้าวโพดและถั่วอัลฟัลฟา สารสีเหลืองที่สกัดจากดอกดาวเรือง และสารสีแดงที่สกัดจากพริก

2 สารสีที่ได้จากการสังเคราะห์ คือสารที่สังเคราะห์ขึ้นโดยกระบวนการทางเคมี ซึ่งแบ่งเป็นสามกลุ่มใหญ่คือ

2.1 สารสีเหลือง ใช้เสริมในอาหารไก่เนื้อและไก่ไข่ เพื่อให้หนังไก่หรือไข่แดงมีสีเหลืองขึ้น

2.2 สารสีแดง ใช้เสริมในอาหารสัตว์ร่วมกับสารสีเหลืองเพื่อให้ไข่แดงมีสีเข้ม

2.3 สารสีส้มอมแดงแอสตาแซนธิน มักใช้ใส่ในอาหารสัตว์น้ำ

2.1.6.2 โปรไบโอติก

เป็นกลุ่มของจุลชีพพวกแบคทีเรีย และเชื้อราที่เสริมในอาหารสัตว์ ในพืชหมักและที่ให้สัตว์กินโดยตรงเพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์และกรดแลกติก ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นโทษต่อสัตว์ ลดปริมาณไนไทรต์และไนเทรตในกระเพาะหมัก ลดปัญหาท้องเสีย เพิ่มความน่ากินของอาหาร และเพิ่มผลผลิตนม

2.1.6.3 เอนไซม์

เอนไซม์เป็นสารประกอบโปรตีนเชิงซ้อน ที่ร่างกายสร้างขึ้นเพื่อเป็นตัวกระตุ้นปฏิกิริยาหรือทำให้สารอื่นเปลี่ยนแปลงโดยที่ตัวมันไม่เปลี่ยนแปลง และมุ่งเน้นใช้ในการย่อยอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่แป้ง (Non-starch polysaccharide, NSP) โปรตีนและไขมัน (ภรณี ต่างวิวัฒน์และคณะ.2553) หรือวัตถุดิบที่มีคุณสมบัติเป็นสารเกาะเกี่ยว (Chelating substances) ที่มีเกาะเกี่ยวธาตุอาหารไว้อาทิ ไฟเตท (Phytate) ทำให้ใช้ประโยชน์ของธาตุฟอสฟอรัสได้น้อยลง นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ให้กับสัตว์อายุน้อย หรือสัตว์สูงอายุเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยอาหารให้สูงขึ้น (จรัส สว่างทัพ. 2548) ดังตารางที่ 2.3

การใช้เอนไซม์ในอาหารสัตว์ในปัจจุบันได้พัฒนามากขึ้น เพื่อให้เหมาะสมกับชนิดของวัตถุดิบอาหารสัตว์ชนิดของสัตว์ และวิธีการผลิตเอนไซม์ด้วยเทคโนโลยีสมัยใหม่ เพื่อนำไปสู่การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสัตว์และลดต้นทุนการผลิตสัตว์ ประโยชน์ที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งคือเนื่องจากเอนไซม์เป็นสารที่มีโปรตีนเป็นส่วนประกอบฉะนั้นจึงย่อยสลายได้ในธรรมชาติ โดยไม่ก่อให้เกิดมลพิษตามมาและไม่มีผลตกค้างในตัวสัตว์ด้วย

เอนไซม์ที่ใช้ในอาหารสัตว์ส่วนมากใช้เพื่อช่วยย่อยอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต และโปรตีน ซึ่งจำแนกชนิดของเอนไซม์ตามแหล่งที่มาได้ดังนี้

1. เอนไซม์จากสัตว์ เช่น ไลเปส (lipase) เพปซิน (pepsin) ทริปซิน (trypsin)

2. เอนไซม์จากพืช เช่น ไคโมพาเนอิน (chymopanain) พาเพอิน (malt papain)

3. เอนไซม์จากจุลชีพ เช่น อะไมเลส (amylase) เซลลูเลส (cellulase) กลูคาเนส (glucanase) อะไมโลกลูโคซิเดส (amyloglucosidase) เฮมิเซลลูเลส (hemicellulase) แล็กเทส (lactase) ไลเปส (lipase) เพกทิเนส (pectinase)

ตารางที่ 2.3ชนิดและประโยชน์ของเอนไซม์ที่ใส่ลงในอาหารสัตว์

ชนิดเอนไซม์	ประโยชน์ที่ได้รับ
อะไมเลส	ย่อยแป้ง
เบต้า-กลูคาเนส	ย่อยกลูแคนในผนังเซลล์พืช
กลูโคซิเดส	ย่อยกลูโคแซน
กาแลคโทซิเดส	ย่อยกาแลคโทแซน
เซลโลไบเอส	ย่อยเซลโลไบโอส
ไซแลนเนส	ย่อยไซแลน
เซลลูเลส	ย่อยเซลลูโลส
ไลเปส	ย่อยลิปิดแท้
โพรทีเอส	ย่อยโปรตีน
ไฟเทส	ย่อยฟอสฟอรัส

ที่มา: ดัดแปลงจาก จรัส สว่างทัพ. (2548)

การผลิตเอนไซม์นั้น โดยมากผลิตขึ้นจากกระบวนการหมักด้วยแบคทีเรียหรือเชื้อรามากมายหลายชนิด โดยแบคทีเรียหรือเชื้อราที่ถูกคัดมาเพื่อผลิตเอนไซม์ควรมีคุณสมบัติดังนี้

1. สามารถผลิตชนิดของเอนไซม์ที่ต้องการเฉพาะเจาะจงได้ (specific enzyme)
2. สามารถเจริญได้ในอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อนั้นๆ
3. สามารถทำเป็นกระบวนการผลิตขนาดใหญ่ในระดับอุตสาหกรรมได้
4. สามารถแยกสายพันธุ์ของแบคทีเรียหรือเชื้อราเพื่อมาพัฒนาต่อไปได้

ประโยชน์ของการใช้เอนไซม์ในอาหารสัตว์

1. ลดอิทธิพลของสารยับยั้งการใช้สารอาหารที่อยู่ในวัตถุดิบอาหารสัตว์ (anti-nutritional factors) เช่น ผนังเซลล์ของข้าวบาร์เล่ห์ ประกอบด้วย เบตา-กลูแคน (ß-glucan) และ อะราบิโนไซเลนส์ (arabinoxylans) ซึ่งยับยั้งการย่อยได้ในไก่เนื้อทำให้ประสิทธิภาพการใช้อาหารลดลงและไก่มักถ่ายเหลวหรือแฉะ การนำเอนไซม์มาใช้ในอาหารสัตว์ที่มีส่วนประกอบของข้าวบาร์เลย์เป็นหลักในอาหารไก่เนื้อ เช่น เอนไซม์ ß-กลูคาเนส จะทำให้ประสิทธิภาพการใช้อาหารและการเจริญเติบโต

ของไก่เนื้อดีขึ้น เนื่องจากเอนไซม์ดังกล่าวสามารถย่อยสลายสารเบตา-กลูแคนได้ ได้มีการประยุกต์ใช้เอนไซม์เบตา-กลูคาเนส และไซแลนเนสในวัตถุดิบอาหารอื่นๆด้วย เช่น ข้าวโอ๊ต ข้าวสาลี และข้าวไรย์ ซึ่งใช้ได้ดีในเวลาต่อมารวมทั้งได้ใช้เพิ่มเติมในอาหารสัตว์อื่นๆด้วยนอกจากไก่เนื้อแล้ว

2. เพิ่มประสิทธิภาพการย่อยได้ของสารอาหาร น้ำย่อยจากสัตว์อาจไม่สามารถย่อยสารอาหารได้ต่างๆได้ดีครบถ้วน ฉะนั้นการใช้ประโยชน์ได้ของสารอาหารย่อมลดน้อยลง ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบและชนิดสัตว์ด้วย เช่น สัตว์กระเพาะเดี่ยวจะไม่มีเอนไซม์ทำหน้าที่ในการย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่มีส่วนประกอบของกากสูงได้โดยตรง การย่อยของสัตว์กระเพาะเดี่ยวก็จะลดน้อยลงตามปริมาณกากในวัตถุดิบอาหารสัตว์ชนิดนั้นๆ หรือการใช้เอนไซม์ไฟเตส (phytase) เพื่อช่วยเพิ่มการย่อยได้ของแร่ธาตุฟอสฟอรัสในพืช ซึ่งอยู่ในรูปที่สัตว์ใช้ประโยชน์ได้น้อย เป็นต้น

3. เพิ่มประสิทธิภาพการย่อยของคาร์โบไฮเดรตประเภทไม่ใช่แป้ง (non-starch polysaccharide หรือ NSP) การย่อย NSP ของสัตว์กระเพาะเดี่ยวนั้น มีประสิทธิภาพต่ำมากขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่วัตถุดิบอาหารสัตว์อยู่ในกระเพาะ และปริมาณแบคทีเรียในลำไส้ โดยทั่วไปแล้วอาจกล่าวได้ว่า สัตว์กระเพาะเดี่ยวไม่นั้นไม่สามารถย่อย NSP ได้เลย ยกเว้นในสุกรการย่อยสลายนั้นเกิดขึ้นได้ในส่วนของลำไส้ใหญ่ โดยอาศัยจุลินทรีย์ในลำไส้เป็นหลัก การผลิตสัตว์ในปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาเอนไซม์มาเพื่อช่วยย่อยส่วนของ NSP ให้อยู่ในรูปของน้ำตาลโมเลกุลเดียว (monosaccharides) ที่เป็นประโยชน์ต่อตัวสัตว์ต่อไป เช่น การใช้เอนไซม์เฮมิเซลลูเลสและเซลลูเลสเป็นต้น

การเพิ่มปริมาณเอนไซม์เพื่อช่วยการย่อยสารอาหารได้ดีขึ้น ในการผลิตเอนไซม์ในสัตว์นั้นอาจมีปริมาณไม่พอเพียงกับสารอาหาร โดยเฉพาะกับสัตว์เล็กหรือสัตว์สูงอายุได้มีการเสริมเอนไซม์ลงในอาหารลูกสุกรและลูกไก่ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการย่อยอาหารให้ดียิ่งขึ้น เช่น ลูกสุกรแรกเกิดในช่วงสองถึงสามสัปดาห์จะมีปริมาณเอนไซม์แลกเทสสูงมากเพื่อย่อยน้ำตาลแล็กโทสในน้ำนม จากนั้นจะลดลงจนเกือบเป็นศูนย์ ดังนั้นน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรตในรูปอื่นๆก็จะมีการย่อยได้ต่ำ การเสริมเอนไซม์ลงในอาหารลูกสุกรจึงเป็นทางหนึ่งที่จะช่วยให้การย่อยอาหารดีขึ้น

2.2 ระบบการย่อยอาหารสัตว์ปีก

ในระบบย่อยอาหารของสัตว์เลี้ยงชนิดต่างๆจะแตกต่างกันออกไปซึ่งมีผลต่อการย่อยและการดูดซึมอาหารและทำให้ธรรมชาติการกินอาหารของสัตว์แตกต่างกันออกไปสัตว์บางชนิดเป็นสัตว์กินเนื้อ (carnivores) สัตว์บางชนิดเป็นสัตว์กินพืช (herbivores) ขณะที่สัตว์บางชนิดกินทั้งเนื้อ

และพืช (omnivores) ทั้งนี้หากพิจารณาจากกายวิภาคของระบบย่อยอาหารจะสามารถจำแนกสัตว์เลี้ยงในฟาร์มออกได้สัตว์กระเพาะเดี่ยวส่วนใหญ่จะใช้ประโยชน์จากอาหารที่มีเยื่อใยสูงได้น้อยมากอย่างไรก็ตามสัตว์กระเพาะเดี่ยวบางชนิดเช่นกระต่ายและม้าซึ่งเป็นสัตว์ที่มีกระบวนการหมักอาหารเยื่อใยสูงโดยจุลินทรีย์ในไส้ติ่งและลำไส้ใหญ่นั้นสามารถใช้ประโยชน์จากอาหารที่มีเยื่อใยสูงได้อย่างมีประสิทธิภาพดั้งนั้นจึงมักใช้อาหารเยื่อใยสูงสำหรับเลี้ยง ม้าและกระต่ายแต่จะต้องใช้อาหารที่มีเยื่อใยต่ำเลี้ยงสุกรและสัตว์ปีกตามลักษณะของทางเดินอาหารคือ

1.สัตว์กระเพาะเดี่ยวที่ไส้ติ่งไม่ทำงาน (nonfunctional ceca) เช่น สุกร ปลา สุนัข

2.สัตว์กระเพาะเดี่ยวที่ไส้ติ่งทำงาน (functional ceca) เช่น ม้า กระต่าย

3.สัตว์ปีก เช่น ไก่

สัตว์เหล่านี้มีโครงสร้างที่สมบูรณ์ทางเดินอาหารของสัตว์เหล่านี้จะมีจุลินทรีย์อยู่ไม่มากและย่อยอาหารที่เยื่อใยสูงไม่มากดังนั้นการเลี้ยงสัตว์เหล่านี้จึงต้องให้อาหารข้นที่ประกอบด้วยเมล็ดธัญพืชผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ฯลฯซึ่งมีเยื่อใยต่ำแทนที่จะเลี้ยงด้วยอาหารหยาบซึ่งมีเยื่อใยสูง (คณะกรรมการกลุ่มผลิตชุดวิชาหลักโภชนศาสตร์และอาหารสัตว์. 2543)

ระบบทางเดินอาหารของสัตว์ปีก มีส่วนที่เป็นกระเพาะอยู่ถึง 3 กระเพาะ สัตว์ปีกจะกินอาหารโดยไม่ได้เคี้ยว ซึ่งส่วนประกอบของระบบทางเดินอาหารของสัตว์ปีก มีดังนี้

1. ปาก (beak) ปากสัตว์ปีกจะเป็นจงอยที่แหลมคม ภายในไม่มีฟัน ใช้จิกอาหารกลืนลงกระเพาะโดยไม่ต้องเคี้ยวในปากจะมีต่อมน้ำลายอยู่บริเวณด้านข้างทั้งสองข้างทำหน้าที่ผลิตน้ำลายซึ่งมีลักษณะเป็นด่างอ่อนๆทำให้อาหารเปียกชื้นและอ่อนนุ่ม และเอนไซม์ ptyalin ซึ่งทำหน้าที่ในการย่อยแป้งไปเป็นน้ำตาลแต่การย่อยในปากเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยเนื่องจากอาหารจะอยู่ในปากเพียงระยะสั้น (อาวุธ ตันโช. 2538) เวลาไก่กินน้ำจะห่อลิ้นเป็นกระพุ้งรับน้ำ แล้วเงยหัวขึ้นเพื่อกลืนให้น้ำนั้นไหลลงสู่คอ มิฉะนั้นน้ำจะไหลออกทางรูจมูก เพราะมีร่องเปิดอยู่ที่เพดานปากบนในปาก มีต่อมกลั่นน้ำย่อยออกมาช่วยคลุกเคล้าอาหารให้สะดวกแก่การกลืนลงหลอดคอ (สุวรรณ เกษตรสุวรรณ. 2535)

2. หลอดอาหาร (esophagus) หลอดอาหารเป็นท่อทางผ่านของอาหารในปากทางด้านหลังของปากไปสู่กระเพาะขั้วกึ๋น หลอดอาหารมีลักษณะเป็นพิเศษที่สามารถขยายตัวได้มาก (ปฐม เลาหะเกษตร. 2540)

3. กระเพาะพัก (crop) เป็นส่วนของหลอดอาหารที่ขยายออกสำหรับเป็นที่เก็บอาหารระยะแรกและทำให้อาหารอ่อนนุ่ม ที่กระเพาะพักนี้มีจุลินทรีย์อยู่บ้าง เช่น พวก *Lactobacilli* ทำหน้าที่ย่อยอาหารให้เป็นกรดอินทรีย์ (organic acid) ซึ่งได้แก่ กรดแลคติก และ กรดอะซิติก (บุญ

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ล้อม ชีวะอิสระกุล. 2541) ระยะเวลาที่อาหารจะอยู่ในกระเพาะพักจะขึ้นอยู่กับขนาดของอาหาร ปริมาณอาหารที่กินและปริมาณอาหารที่อยู่ในกึ๋น ในกระเพาะพักไม่มีการสร้างเอนไซม์ แต่มีเอนไซม์ ptyalin จากปากทำหน้าที่ในการย่อยแป้งต่อไป (อาวุธ ตันโช. 2538) กระเพาะพักของนกพิราบจะมีเซลล์พิเศษสำหรับสร้างน้ำนม (crop milk) ซึ่งเป็นของเหลวสีขาวคล้ายนมสำหรับเลี้ยงลูกอ่อน (อรวรรณ ชินราศรี. 2547)

4. กระเพาะจริง (proventiculus) ต่ออยู่ทางด้านหลังของกระเพาะพัก เป็นบริเวณที่มีต่อมต่าง ๆ อยู่มากมายจึงเรียกว่า Glandular stomach ทำหน้าที่ในการผลิตเอนไซม์เพปซิน (pepsin) และกรดไฮโดรคลอริก (HCI) (บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2541) โดยเอนไซม์เพปซินทำหน้าที่ในกานย่อยโปรตีนโมเลกุลใหญ่ให้มีขนาดเล็กลง ส่วนกรดไฮโดรคลอริกทำหน้าที่ในการปรับสภาพพีเอสในกระเพาะให้เป็นกรดและช่วยย่อยโปรตีน (อาวุธ ตันโช. 2538)

5. กระเพาะบด (gizzard) บางครั้งเรียกว่า กึ๋น มีรูปร่างคล้ายก้อนกล้ามเนื้อสีแดง รูปค่อนข้างกลมแบน เชื่อมต่อระหว่างขั้วกึ๋นกับลำไส้อ่อน กึ๋นประกอบด้วยกล้ามเนื้อที่มีพลังมากอยู่ 2 คู่ ผิวภายในประกอบด้วยเยื่อบุหนาซึ่งจะมีการสึกหรอและเปลี่ยนใหม่อยู่เสมอ กึ๋นทำหน้าที่บดย่อยอาหารให้แตกละเอียด โดยภายในมีกรวดสะสมอยู่เพื่อช่วยบดย่อยอาหาร (ปฐม เลาหะเกษตร. 2540)

6. ลำไส้เล็ก (small intestine) ทำหน้าที่ดูดซึมอาหารเข้าสู่ร่างกายเป็นอวัยวะย่อยอาหารส่วนที่อยู่ถัดจากกึ๋น แบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนต้น (duodenum) ส่วนกลาง (jejunum) และส่วนท้าย (ilium) ลำไส้ส่วนต้นมีลักษณะเป็นห่วง (loop) จึงเรียกลำไส้ส่วนนี้ว่า duodenum loop ระหว่างห่วงจะมีตับอ่อนเชื่อมติดอยู่กับลำไส้เล็กมีหน้าที่สำคัญ 3 ประการ คือ

1. ทำหน้าที่ผลิตและหลั่งน้ำย่อย (intestinal juices) ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยโปรตีนและน้ำตาล และรับน้ำย่อยจากตับอ่อน พวกเอนไซม์ amylas ทำหน้าที่ย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล เอนไซม์ไลเปส (lipase) ย่อยไขมัน และเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) ทำหน้าที่ย่อยโปรตีน นอกจากนั้นยังมีน้ำดี จากตับปล่อยเข้าไปในลำไส้ส่วนต้น เพื่อช่วยในการย่อยไขมันแล้ว นอกจากนั้นก็เป็นหน้าที่ของน้ำย่อยจากลำไส้เล็กทำการย่อยต่อเพื่อให้สมบูรณ์ ร่างกายนำไปใช้ได้ คือจากแป้งจนเป็นน้ำตาลกลูโคส ย่อยไขมันให้เป็นกรดไขมัน และกลีเซอไรล และย่อยโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโน

2. ทำหน้าที่ดูดซึม (absorbs) อาหารที่ย่อยแล้วเข้าไปในเส้นเลือด เซลล์ผิวของลำไส้เล็กมีพื้นที่มากจึงสามารถดูดซึมอาหารที่ย่อยแล้ว ผ่านผนังลำไส้เล็กเข้าไปในเส้นเลือดได้รวดเร็วมาก

3. ทำหน้าที่ขับเคลื่อนอาหารที่สัตว์ย่อยไม่ได้แล้วไปยังส่วนที่เป็นไส้ติ่ง และลำไส้ใหญ่ด้วยการบีบตัวของกล้ามเนื้อลำไส้เล็ก บริเวณลำไส้จะมีอวัยวะต่างๆที่ผลิตสารส่งเข้ามาช่วยในการย่อยอาหารให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น ได้แก่

148286

- ตับอ่อน (pancreas) เป็นแผ่นของเนื้อเยื่อสีชมพูติดอยู่ระหว่างห่วงของลำไส้เล็ก หน้าที่สำคัญของตับอ่อน คือ สร้างน้ำย่อย ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ อะไมเลส (amylase) ทริพซิน (trypsis) และไลเพส (lipase) น้ำย่อยจะถูกส่งไปยังส่วนล่างของลำไส้เล็กส่วนต้นของท่อตับอ่อน น้ำย่อยจากตับอ่อน มีลักษณะค่อนข้างเป็นด่างจึงช่วยให้สภาพในลำไส้เป็นกลางช่วยให้การย่อยอาหารได้ดีขึ้น นอกจากนี้ตับอ่อนยังสร้างฮอร์โมนอินซูลิน (insulin) ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมในการใช้น้ำตาลของร่างกายอีกด้วย

- ตับ (liver) ตับมีด้วยกัน 2 ชิ้นใหญ่ เกาะติดอยู่ระหว่างกึ๋นกับลำไส้ ตับทำหน้าที่สร้างน้ำดี มีลักษณะเป็นของเหลวสีค่อนข้างเขียว มีความเป็นด่าง นอกจากนั้นตับยังทำหน้าที่สำคัญๆ อีกหลายอย่างคือ ก่อนร่างกายจะนำอาหารที่ผ่านการย่อยแล้วไปใช้จะต้องผ่านตับทำการกลั่นกรอง และกำจัดสิ่งมีพิษต่อร่างกายบางชนิดเสียก่อน ตับทำหน้าที่เก็บไกลโคเจน(glycogen) หรือแป้งในสัตว์ และทำหน้าที่เปลี่ยนของเสียที่ได้จากการย่อยโปรตีนให้เป็นกรดยูริก และในรูปอื่นที่ไต สามารถขับออกจากร่างกายได้

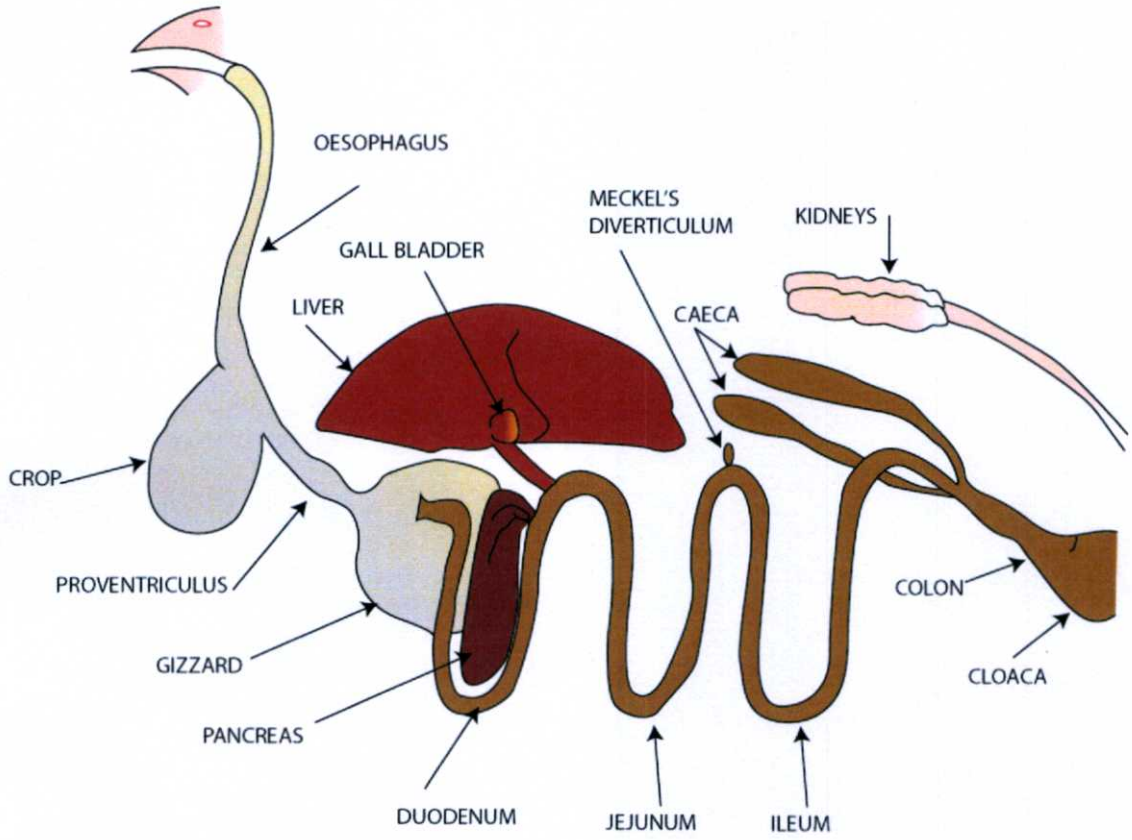
- ถุงน้ำดี (gall bladder) ถุงน้ำดีมีลักษณะเป็นถุงเล็กๆสีเขียวเข้ม อยู่ด้านล่างของตับ นกบางชนิดไม่มีถุงน้ำดี น้ำดีที่ตับสร้างมีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลือง จะผ่านเข้าสู่ส่วนล่างของลำไส้เล็กทางท่อน้ำดี ซึ่งมีด้วยกัน 2 ท่อทางด้านขวา มีขนาดใหญ่และมีลักษณะเป็นถุง เป็นที่เก็บน้ำดีชั่วคราว เมื่อมีอาหารในลำไส้เล็ก ถุงน้ำดีจะบีบตัวขับน้ำดีไปยังลำไส้เล็ก ท่อน้ำดีทางด้านซ้ายมีขนาดเล็กจะปล่อยน้ำดีบางส่วนไปยังลำไส้เล็กโดยตรง (อรวรรณ ชินราศรี. 2547)

7. ไส้ติ่ง (caecum) ในสัตว์ปีกเกือบทุกชนิดมีไส้ติ่ง 2 อัน มีลักษณะเป็นถุงตอนปลายขยายใหญ่กว่าตอนโคนถุง เชื่อมต่อกับท่อทางเดินอาหารบริเวณรอยต่อระหว่างลำไส้เล็กกับลำไส้ใหญ่ เป็นส่วนสุดท้ายสำหรับการย่อยอาหารและการดูดซึมน้ำเป็นบริเวณที่เกิดการหมัก (อรวรรณ ชินราศรี. 2547) จะมีจุลินทรีย์ช่วยในการหมักอาหารให้ได้เป็นกรดไขมันระเหยได้ (volatile fatty acid) แต่ไม่มีความสำคัญมากนัก เพราะไก่ไม่สามารถย่อยเซลลูโลส (cellulose) ในธัญพืชได้ แต่อาจย่อยเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ได้บ้าง (บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2541)

8. ลำไส้ใหญ่ (large intestine) อยู่ต่อจากลำไส้เล็กและสิ้นสุดที่ทวารร่วมมีความยาวเพียง 10 ซม. กระบวนการย่อยอาหารในลำไส้เล็กอาจจะต่อเนื่องถึงลำไส้ใหญ่ กากอาหารหรืออาหารที่ผ่านการย่อยแล้วและอาหารบางส่วนที่ไม่ถูกย่อยหรือย่อยไม่ได้จะเคลื่อนตัวมาอยู่ในลำไส้ส่วนนี้เพื่อการขับถ่ายออก นอกจากนี้จะมีการดูดซึมน้ำจากกากอาหารเข้าสู่ร่างกายทำให้กากอาหารมีลักษณะแห้ง (อาวุธ ตันโช. 2538)

9. ทวาร (vent) เป็นที่ขับกากอาหารออกนอกร่างกาย และยังเป็นที่รวมของท่อนำไข่ในสัตว์ปีกเพศเมียด้วย (อรวรรณ ชินราศรี. 2547) น้ำย่อยในทางเดินอาหารของสัตว์ปีกจะคล้ายคลึงกับสัตว์กระเพาะเดี่ยวอื่นๆแต่ไม่มีแลคเตส (lactase) เพราะไก่ไม่ใช่สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นอกจากนี้ยังพบว่า

ไก่ต่างจากลูกสุกรคือ ลำไส้เล็กสามารถผลิตเอนไซม์ amylase, maltaseและ sucrase ได้ตั้งแต่ยังเล็ก เพราะลูกไก่ต้องกินธัญพืชตั้งแต่เกิด (บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2541)



ภาพที่ 2.2 ระบบทางเดินอาหารของไก่ (Dingle. 1990)

2.3 องค์ประกอบเยื่อใยของพืชอาหารสัตว์

อาหารสัตว์มีส่วนประกอบสำคัญ คือ ผนังเซลล์พืช ประเภทของผนังเซลล์พืชเป็นส่วนที่สำคัญ เพราะมีผลต่อการย่อยอาหารโดยเฉพาะ ในอาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์เพื่อผลิตเป็นเนื้อ ส่วนประกอบของเซลล์พืชประกอบด้วย ชั้นนอกเรียกว่า ผนังเซลล์พืชหลัก ชั้นที่สองภายในเซลล์เรียกว่า ผนังเซลล์รอง (Schroeder. 2004)

ชนิดของเยื่อใยที่สำคัญ ในพืชอาหารสัตว์มี 3 ชนิด คือ เฮมิเซลลูโลส เซลลูโลสและลิกนิน (ภาพที่ 2.3) ในการวิเคราะห์หาปริมาณเยื่อใยโดยวิธีดีเทอร์เจนท์ (Detergent method) หรือเรียกว่า วิธีการวิเคราะห์แบบ Forage fiber analysis แทน วิธีวิเคราะห์นี้พัฒนาโดย Goering และ Van Soest แห่งกระทรวงเกษตรสหรัฐอเมริกา (บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2541) ซึ่งวิธีการนี้เป็นวิธีที่มีความเหมาะสมอย่างยิ่ง สำหรับการวิเคราะห์อาหารสัตว์ที่มี เยื่อใยสูงๆเช่น พืชอาหารสัตว์ การวิเคราะห์

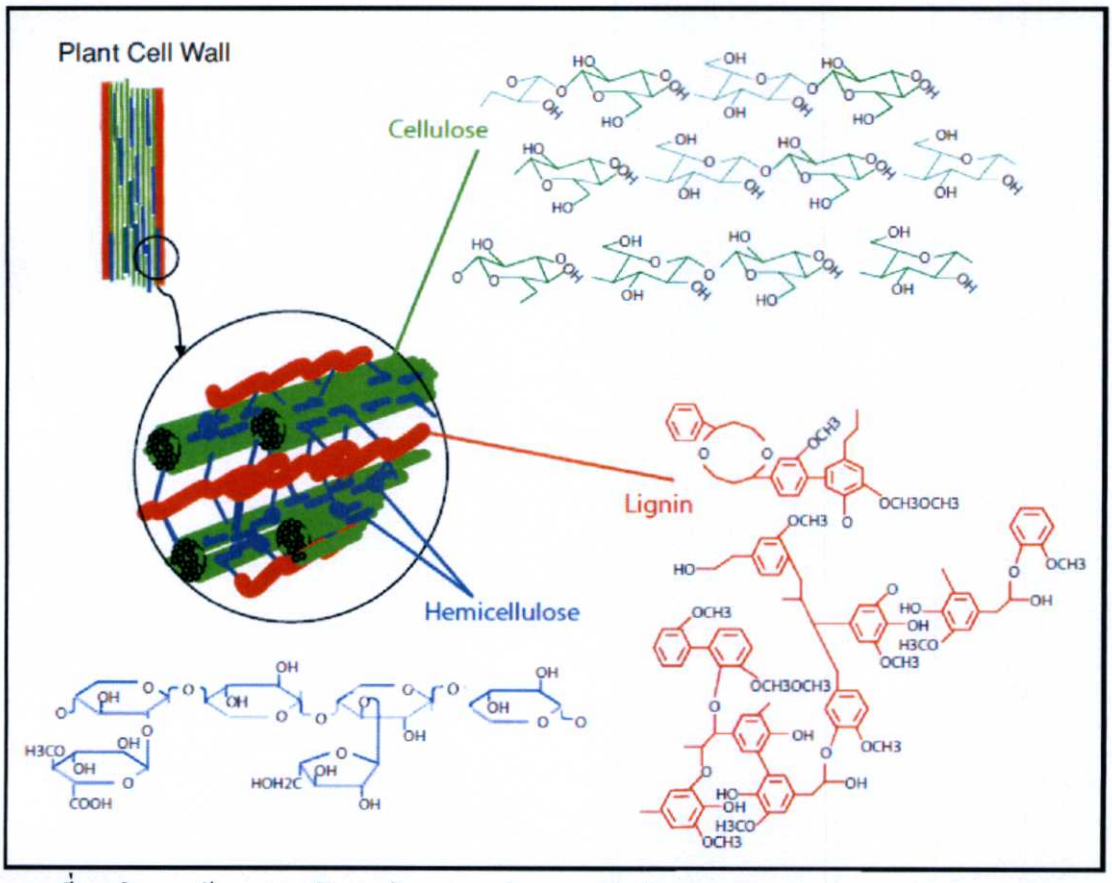
ด้วยวิธีนี้จะสามารถแยก ส่วนของอาหารสัตว์หรือพืชอาหารสัตว์ ในรูปของวัตถุแห้งออกได้ 2 พวก ใหญ่ๆ คือ

1. ส่วนที่อยู่ภายในเซลล์พืชทั้งหมด เรียกว่า Cell Contents หรือ Neutral Detergent Soluble (NDS) ประกอบด้วย น้ำตาล แป้ง คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ (Water soluble carbohydrate) กรดอะมิโนโปรตีนพวก Soluble protein สารประกอบพวก Non-protein nitrogen ไขมัน เรซิน แทนนิน เพคติน และวิตามินพวก Water soluble vitamin เป็นต้น น้ำย่อยของสัตว์ทุกชนิดสามารถย่อยวัตถุแห้งนี้ได้เกือบทั้งหมดและสัตว์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้

2. ส่วนที่เป็นผนังเซลล์ของพืชทั้งหมด เรียกว่า Cell wall constituents หรือ Neutral Detergent Fiber (NDF) ได้แก่ เยื่อใยทั้งหมด คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน นอกจากนี้ยังมี คิวติน ซิลิกา และเคราติน ประกอบอีกบ้างเล็กน้อย น้ำย่อยในกระเพาะหรือลำไส้ของสัตว์ทั่วไปไม่สามารถย่อยเยื่อใยเหล่านี้ได้ สัตว์เหล่านี้จึงไม่สามารถใช้ประโยชน์ได้ ยกเว้นสัตว์เคี้ยวเอื้องและสัตว์จำพวกม้ากระต่าย ซึ่งมีจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยเซลลูโลส และ เฮมิเซลลูโลส ให้เป็น Volatile Fatty Acid (VFA) อยู่ในกระเพาะรูเมนและลำไส้ส่วน Caecum ซึ่งสัตว์จะสามารถดูดซึม VFA ไปใช้ประโยชน์ได้ต่อไป NDF แบ่งได้เป็น 2 พวก คือ

2.1 เยื่อใยพวก Acid Detergent Soluble เยื่อใยชนิดนี้คือ เฮมิเซลลูโลส ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลชั้นที่สองของพืช เป็นสารประกอบพวกคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ละลายน้ำ ประเภท Hetero – generous polysaccharide คือ มีโมเลกุลของน้ำตาลหลายชนิดมาเกาะติดกัน ได้แก่ กลูโคส กาแลคโตส แมนโนส ไซโรส อะราบิโนส และกรดยูโรนิค เฮมิเซลลูโลสสามารถละลายได้ดีในกรดอ่อนและด่างอ่อน เฮมิเซลลูโลสในพืชตระกูลหญ้าจะประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลไซโรสมาเชื่อมต่อกันแบบ เบต้า 1-4 เป็นสายยาว และมีกิ่งก้านสาขาที่ประกอบด้วยกรดเมทธิล กลูคิวโรนิค กลูโคส กาแลคโตส และอะราบิโนส พืชตระกูลหญ้าจะมีเฮมิเซลลูโลสสูงกว่าพืชตระกูลถั่ว จะพบเฮมิเซลลูโลสมากที่ส่วนใบของพืช พืชที่กำลังงอกจะใช้เฮมิเซลลูโลสที่มีในเมล็ดเป็นอาหาร เนื่องจากสัตว์ทุกชนิดไม่มีน้ำย่อยสำหรับย่อยเฮมิเซลลูโลส แต่จุลินทรีย์ในระบบการย่อยอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง ม้าและกระต่าย สามารถย่อยเฮมิเซลลูโลสให้เป็น VFA ได้ ดังนั้นสัตว์เหล่านี้จึงสามารถใช้ประโยชน์จากเฮมิเซลลูโลสได้ แต่เนื่องจากในพืชอาหารสัตว์จะพบเฮมิเซลลูโลสอยู่ร่วมกับลิกนินที่บริเวณผนังเซลล์ชั้นที่สองดังนั้น ลิกนินจึงขัดขวางการย่อยได้ของเฮมิเซลลูโลส ทำให้เฮมิเซลลูโลสถูกย่อยได้ไม่หมด การที่เฮมิเซลลูโลสจะถูกย่อยได้มากน้อยเพียงใด ขึ้นอยู่กับปริมาณของลิกนินถ้าพืชอาหารสัตว์ 2 ชนิด มีปริมาณเฮมิเซลลูโลสเท่ากัน แต่พืชอาหารสัตว์ชนิดแรกมีลิกนินต่ำกว่าพืชอาหารสัตว์ชนิดที่สอง การย่อยได้ของเฮมิเซลลูโลสของพืชอาหารสัตว์ชนิดแรกจะย่อยได้มากกว่าการย่อยเฮมิเซลลูโลสของพืชอาหารสัตว์ชนิดที่สอง การทำลายพันธะที่เชื่อมระหว่างเฮมิเซลลูโลสกับลิกนิน ทำได้โดยการใช้สารประเภทด่างหรือสาร Oxidizing agent สารนี้จะไปทำลายพันธะระหว่างเฮมิเซลลูโลสกับลิกนินทำให้การย่อยได้ของเฮมิเซลลูโลสเพิ่มมากขึ้น

นอกจากนี้ เฮมิเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พืชเช่นกัน โดยเอนไซม์จากสัตว์กระเพาะเดี่ยวไม่สามารถย่อยได้ แต่จุลินทรีย์สามารถย่อยได้เช่นเดียวกับเซลลูโลส โดยที่เฮมิเซลลูโลสไม่ได้มีโครงสร้างคล้ายเซลลูโลส แต่เป็นส่วนหนึ่งของผนังเซลล์ระหว่างตำแหน่งที่เซลล์ต่อกันอยู่ เรียกว่า มิดเดิลลาเมลลา พบในต้นอ่อนของพืชที่กำลังเจริญเติบโตและพบบริเวณผิวนอกที่หุ้มเมล็ด (hulls) ในถั่ว เมล็ดข้าวโพดและรำข้าวสำลีพบว่ามีเฮมิเซลลูโลสเป็นปริมาณมาก ซึ่งจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารส่วนปลายสามารถย่อยได้ประมาณ 50 – 80% (เสกสม อาตมางกูร. 2545)



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส เซลลูโลสและลิกนิน (Kowsari. 2012)

2.2 เยื่อใยพวก Lignocellulose หรือ Acid Detergent Fiber (ADF) ประกอบด้วย เซลลูโลส และลิกนิน นอกจากนี้จะมี คิวติน และ ซิลีกา อีกบ้างเล็กน้อย ส่วนประกอบของผนังเซลล์พืชส่วนใหญ่จะเป็นเซลลูโลสซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตพวกที่ไม่ละลายน้ำมีสูตรโครงสร้างที่มีโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสมาต่อกันแบบเบตา 1-4 เป็นสายยาว ไม่มีกิ่งก้านสาขา โดยมีออกซิเจนเป็นตัวเชื่อมระหว่างโมเลกุลของกลูโคส แต่ละโมเลกุลของเซลลูโลสจะประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสอย่างน้อย 1000 โมเลกุล นั่นคือ น้ำตาลกลูโคสที่ผนังเซลล์ของพืชจะอยู่ที่เซลลูโลสทั้งหมด การที่โมเลกุลของกลูโคสมาต่อกันทำให้โมเลกุลของเซลลูโลสมีความแข็งแรง ถูกย่อยด้วยกรดอ่อนและด่างอ่อนได้ยากแต่กรดแก่สามารถไฮโดรไลท์เซลลูโลสให้เป็นกลูโคสได้ น้ำย่อยของ

สัตว์ทุกชนิดไม่สามารถย่อยเซลลูโลสได้ แต่จุลินทรีย์ที่อยู่ในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้องและลำไส้เล็กของม้าและกระต่ายสามารถย่อยเซลลูโลสได้ ดังนั้น สัตว์เคี้ยวเอื้อง ม้า และกระต่าย จึงสามารถใช้เซลลูโลสเป็นประโยชน์ได้ แต่การย่อยได้ของเซลลูโลสจะมากหรือน้อยเพียงใดนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณของลิกนิน เช่น เดียวกับกรณีของเฮมิเซลลูโลส (กรมปศุสัตว์. 2556)

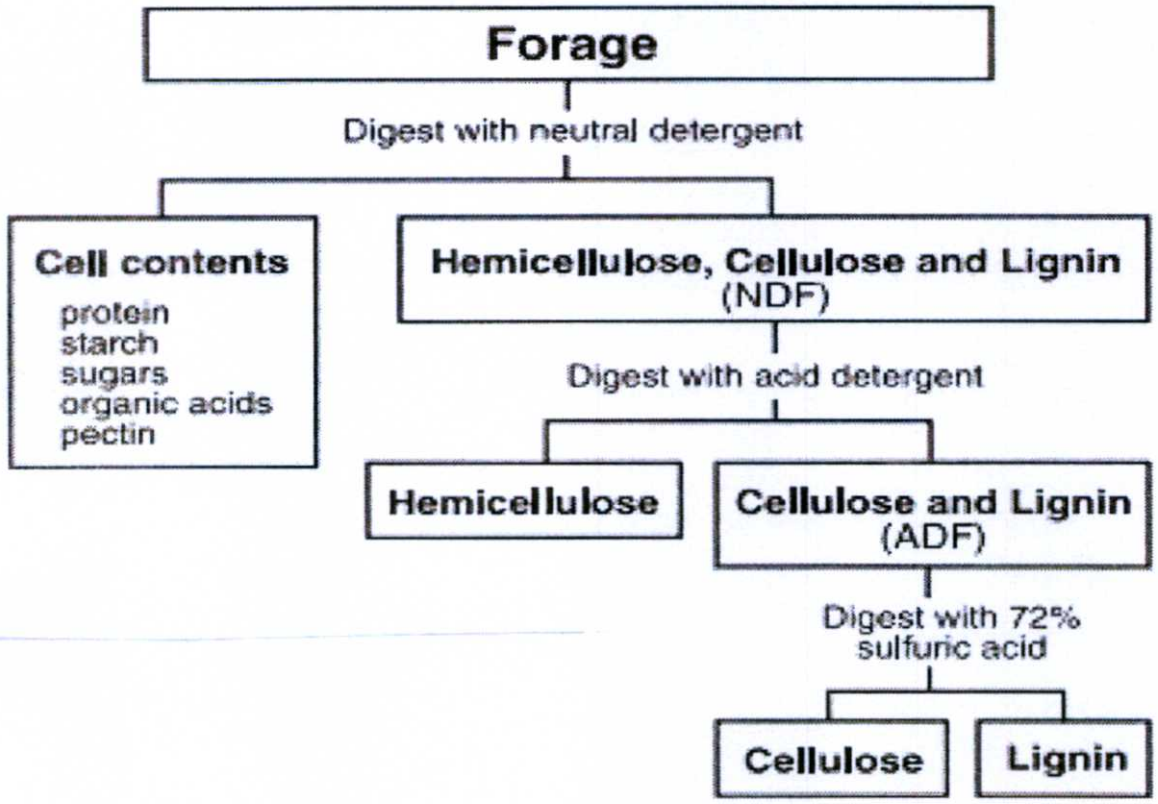
ลิกนิน เป็นเยื่อใยที่เป็นสารประกอบ โพลีเมอร์ ของพวก Phenylpropanoid ประกอบด้วย ธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน และ ไนโตรเจน โดยมีไนโตรเจนประกอบอยู่ประมาณ 1-5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ลิกนินเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์พืช ทำให้ผนังเซลล์พืชแข็งแรง เป็นส่วนประกอบของเปลือก ซัง หรือ ส่วนที่เป็นเยื่อใยของราก ลำต้น และจะถูกสร้างจากส่วนโคนต้นไปสู่ยอดเมื่อพืชมีอายุมากขึ้นปริมาณลิกนินก็จะเพิ่มมากขึ้นด้วย (Schroeder.2004)

การวิเคราะห์ทำโดยต้มตัวอย่างกับสารละลายที่เรียกว่า Neutral detergent solution ส่วนที่ละลายและถูกกรองทิ้งไปคือส่วนที่อยู่ภายในเซลล์ (cell content, CC) ซึ่งเป็นส่วนที่ย่อยได้ง่าย (non structural carbohydrate, NSC) ส่วนที่เป็นกากเหลืออยู่ในตระแกรงกรองคือ ส่วนของผนังเซลล์ (cell wall constituents, CWC) ซึ่งเรียกว่า นิวทรัล ดีเทอร์เจนท์ ไฟเบอร์ (Neutral detergent fiber, NDF)

ส่วนที่เป็นผนังเซลล์นี้เมื่อนำมาต้มกับสารละลาย acid detergent ส่วนที่ละลายและถูกกรองทิ้งไป (acid detergent soluble, ADS) คือ เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) ส่วนที่เป็นกากเหลืออยู่ในตระแกรงกรองคือส่วนของลิกนินและเซลลูโลส (lingo-cellulose) เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งค่านี้เรียกว่า acid detergent fiber (ADF)ประกอบด้วยเซลลูโลส ลิกนิน โปรตีนที่ถูกทำลายเนื่องจากความร้อน (heat damaged protein) และซิลิก้า (silica)

เมื่อนำ acid detergent fiber มาต้มกับกรดกำมะถัน (72%H_2SO_4) หรือสารละลายด่างทับทิม (Potassium permanganate, $KMnO_4$) ส่วนที่สลายตัวไปคือ cellulose ส่วนที่เหลืออยู่คือ ลิกนินและเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (Acid insoluble ash, AIA) ซึ่งเมื่อนำไปเผา ลิกนินจะสลายตัวไปเหลือแต่ AIA ซึ่งนำมาหักลบคำนวณหาค่าลิกนิน (acid detergent lignin, ADL) ได้

จากการวิเคราะห์โดยวิธีนี้ จะทำให้ทราบปริมาณสารที่อยู่ภายในเซลล์ ซึ่งเป็นโภชนะที่ย่อยได้ง่าย และองค์ประกอบของผนังเซลล์ส่วนต่างๆ คือ เซลลูโลส (cellulose), เฮมิเซลลูโลส (hemicelluloses) และ ลิกนิน (lignin) ทำให้สามารถประเมินคุณค่าทางอาหารหยาบได้ ภาพการวิเคราะห์แบบวิธีดีเทอร์เจนท์แสดงไว้ในภาพที่ 2.4



ภาพที่ 2.4 การวิเคราะห์โดย วิธี Detergent method (Schroeder . 2004)

2.4 จุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนกระบือ

Bos Bubalis เป็นชื่อวิทยาศาสตร์ของกระบือ (จรัญ จันทลักขณา. 2527)กระบือที่เลี้ยงกันตามบ้านมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Bubalus bubalis*แม้ว่ากระบือบางส่วนที่มีพันธุ์ประวัติ แต่ส่วนใหญ่เป็นกระบือที่ไม่รู้ว่าเป็นพวกใดและไม่ได้รับการคัดเลือกหรือผสมพันธุ์เพื่อการเพิ่มผลผลิต ได้มีการจำแนกกระบือออกเป็น 2 พวกคือ

1. กระบือปลัก (Swamp Buffalo)
2. กระบือแม่น้ำ (River Buffalo)

กระบือปลัก ชอบนอนในน้ำหรือปลักโคนในที่ๆพอจะหาได้ ผู้คนเลี้ยงไว้ใช้งานนอกจากนี้กระบือสามารถย่อยอาหารได้ดีกว่าโค โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าอาหารนั้นมีเซลลูโลสสูงได้มีการทดลองหนึ่งแสดงให้เห็นว่าโคสามารถย่อยเซลลูโลสของฟางข้าวสาลีได้ 24.3% และกระบือย่อยได้ 30.7% และยังมีการทดลองอื่นอีกพบว่าโคย่อยเส้นใยในฟางข้าวได้ 64.7% และกระบือย่อยได้ 79.8% (จันทรา กอนันทา. 2532) กระบือเป็นสัตว์มีกระเพาะ 4 ส่วนคือกระเพาะรังผึ้ง กระเพาะผ้าขี้ริ้ว กระเพาะสามสิบกรีบและกระเพาะแท้

จุลินทรีย์ในรูเมนส่วนใหญ่เป็นพวกที่ไม่ต้องการออกซิเจน (obligate anaerobes) แต่อาจมีพวกที่สามารถใช้ออกซิเจนได้ด้วยอยู่บ้างบางชนิด พวกนี้จัดเป็น facultative anaerobes มีหน้าที่ช่วยใช้ออกซิเจนที่ติดเข้ามากับอาหารหรือเข้ามาขณะที่สัตว์เคี้ยวและกลืนอาหาร จุลินทรีย์เข้ามาอยู่ในตัวสัตว์ตั้งแต่อายุประมาณ 6 สัปดาห์ โดยติดมากับน้ำและอาหาร หรือการสัมผัสกับสัตว์ใหญ่ๆ(บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2541) ภายในกระเพาะรูเมน มีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมที่สุดกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เช่นระดับ pH 5.5-7.0 และอุณหภูมิ 39-40 °C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เอนไซม์ส่วนใหญ่ ทำงานได้ดี (เทอดชัย เวียรศิลป์. 2548) จุลินทรีย์ในกระเพาะหมักสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มตามชนิดของจุลินทรีย์ได้แก่ แบคทีเรีย (bacteria) มีอยู่ประมาณ 80 % โปรโตซัว (protozoa) มีประมาณ 15% และเชื้อรา (fungi) มีประมาณ 5% แต่ถ้าคิดเป็นน้ำหนักของจุลินทรีย์ทั้งหมดโปรโตซัวจะมีผลผลิตประมาณ 40% ของจุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก (Russel and Rychlik. 2001: ทรงศักดิ์ จำปาวะดี. 2551) แบคทีเรียมีบทบาทในการย่อยอาหารสูงกว่าจุลินทรีย์กลุ่มอื่นโดยแบคทีเรียใช้อาหารประเภทเยื่อใยเป็นแหล่งพลังงานร่วมกับไนโตรเจนเพื่อสังเคราะห์เป็นโปรตีนของจุลินทรีย์ และเพิ่มจำนวนประชากรของแบคทีเรียในกระเพาะหมัก (ทรงศักดิ์ จำปาวะดี. 2551) จุลินทรีย์เหล่านี้จะช่วยในการสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยเยื่อใยพืชเปลี่ยนเป็นโภชนะ ในกระเพาะหมักของกระบือจะมีแบคทีเรียมากที่สุด โดยโคกระบือที่ปล่อยเลี้ยงตามธรรมชาติในชนบทของประเทศไทยจะมีแบคทีเรียในกระเพาะหมักของกระบือ 1.61 x10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในโคจะพบแบคทีเรีย 1.36 x 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Wanapat. 2001) ในการศึกษาประชากรของแบคทีเรียในกระเพาะหมักของกระบือปลักในประเทศไทยด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลโดยการวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมของยีน 16SrRNA พบว่ามีความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียอยู่สูง โดยมีกลุ่มประชากรแบคทีเรีย Low G+C gram-positive bacteria มากที่สุดถึง 57.8% และเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสและไซแลนเนสได้ (ศรัณยา สถิตมั่นวิวัฒน์. 2551) ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเชื้อจากกระเพาะหมักของกระบือในประเทศไทยสามารถค้นพบแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ๆได้ จุลินทรีย์ที่พบในกระเพาะรูเมนกระบือได้แก่

2.4.1 แบคทีเรีย (Bacteria)

แบคทีเรียมีประมาณ 1 พันล้าน ถึง 1 แสนล้านตัวต่อ มล. (10^9-10^{11}/ml) มีขนาดต่างๆและรูปร่างต่างกัน ซึ่งมี 3 ประเภทใหญ่ๆ คือ cocci, rod และ spiral จุลินทรีย์ที่พบในรูเมนมีมากกว่า 100 species แต่ที่พบมากกว่า 10 ล้านตัวต่อ มล. มีเพียงประมาณ 30 species ซึ่งอาจแบ่งได้เป็นประเภทใหญ่ๆตามกิจกรรมของมันคือ พวกที่ใช้ เซลลูโลส (cellulose), เฮมิเซลลูโลส (hemicelluloses), แป้ง , น้ำตาล, กรดที่เกิดขึ้น (intermediate acids), โปรตีน, ไขมัน และเพคติน รวมทั้งพวกที่สร้างมีเทนและสร้างแอมโมเนีย จุลินทรีย์บางชนิดอาจทำหน้าที่ได้หลายอย่าง เช่น *Butyrivibrio fibrisolvens*

สามารถย่อยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส เพคติน ไขมันและโปนตีนได้ *Bacteroides ruminicola* ก็สามารถย่อยเฮมิเซลลูโลส แป้ง เพคติน โปรตีน ยูเรียและสร้างแอมโมเนียได้ (บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2541) จากรายงานการเพาะเลี้ยงเชื้อจากกระเพาะหมักของโค พบว่ามีแบคทีเรียที่ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตเป็นแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่สุด โดยพบแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลส ได้แก่ *Fibrobacter succinogenes* , *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcusalbus*, *Clostridium cellobioparum*, และ *Clostridium Longisporum* เป็นต้น (สุริยะ สะวานนท์. 2551) และแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส ได้แก่ *Eubacterium uniformis* และ *Eubacterium xylanophilum* (Kamra. 2005) เป็นต้น

ในประเทศไทยก็มีการคัดแยกแบคทีเรียจากของเหลวในกระเพาะหมักของโคพื้นเมืองที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งชนิด rumen fluid glucose cellobiose agar บ่มเชื้อที่ 37 °C ในสภาวะไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 3 วัน พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นแกรมบวกรูปกลม และเมื่อแยกแบคทีเรียที่สลายเซลลูโลสโดยใช้ cellulose agar บ่มที่ 37 °C ในสภาพไร้ออกซิเจนได้แบคทีเรียทั้งหมด 101 ไอโซเลท ตรวจสอบความสามารถในการสลายเซลลูเลส โดยวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่า มี 31 ไอโซเลท มีความสามารถสลายเซลลูโลสได้สูง (ระพีพรรณ อินปั๋นแก้ว. 2530)

นอกจากนี้ก็ยังมีการศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสจากในกระเพาะกระบือ คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสจากกระเพาะหมักของกระบือบนอาหาร rumen fluid glucose cellobiose agar บ่มเชื้อในสภาวะไร้อากาศเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 4.8 x 10^4 CFU/ml คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันได้ 32 ไอโซเลท เมื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยเซลลูโลสและไซแลนบนอาหาร CMC agar และ xylan agar พบแบคทีเรียที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจำนวน 19 ไอโซเลทและเอนไซม์ไซแลนเนสจำนวน 4 ไอโซเลท และเมื่อทำการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียที่พบกิจกรรมเอนไซม์สูง 6 ไอโซเลทจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ยีน พบว่ามีความเหมือนมากที่สุดกับสายพันธุ์ *Bacillus pumilus* (96%), *Bacillus subtilis* (100%), *Corynebacterium* sp. (94%), *Corynebacterium* sp. (99%), *Staphylococcus* sp. (100%) และ Uncultured bacterium (99%) โดยไอโซเลท ID2R1P2 ที่คาดว่าน่าจะเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่เพราะมีความคล้ายกับ *Bacillus pumilus* เพียง 96% มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและไซ

แลนเนสมากที่สุดบนอาหารแข็ง จึงนำไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ พบว่าการเลี้ยงในอาหาร CMC broth ที่ความเข้มข้น CMC3% และ yeast extract 0.1% บ่มที่อุณหภูมิ 39°C pH 5.0 เป็นเวลา 5 วัน ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุด และการเลี้ยงในอาหาร xylan broth ที่ความเข้มข้นไซแลน 1% และ yeast extract 0.1% บ่มที่อุณหภูมิ 39°C pH 5.0 เป็นเวลา 3 วัน ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซแลนเนสสูงที่สุด และเมื่อศึกษาการทำงานของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 6.0 อุณหภูมิ 50°C ที่เวลา 10 นาที มีความเสถียรของเอนไซม์ในช่วง pH กว้างคือ 5.0-10.0 และสามารถทนความร้อนได้ดีถึงอุณหภูมิ 90°C โดยยังพบกิจกรรมของเอนไซม์มากกว่า 50% ส่วนการทำงานของเอนไซม์ไซแลนเนสนั้นสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 8.0 ที่อุณหภูมิ 70°C ระยะเวลาการบ่ม 10 นาที มีความเสถียรของเอนไซม์ในช่วง pH กว้างคือ 3.0-10.0 และสามารถทนความร้อนได้ถึงอุณหภูมิ 80 °C นอกจากนี้ไอโซเลท ID2R1P2 สามารถย่อยสับสเตรตได้ทั้งคาร์บอกซีเมททิลเซลลูโลส (CMC) ไซแลน และ กระดาษกรอง (มานิสา บุพตา. 2555)

มีงานวิจัยในต่างประเทศโดย Sewell *et al.* (1989) สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียชนิดใหม่ได้ 6 ไอโซเลท ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไซแลนเนสจากกระเพาะหมักของโค เมื่อจัดจำแนกสายพันธ์ยังพบว่ามีความใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *Butyrivibrio fibrisolvens* และสามารถย่อยสลายไซแลนจากหญ้า Napier ได้ รายงานของ Oyeleke and Okusanmi (2008) ยังระบุว่าสามารถทำการคัดแยกจุลินทรีย์จากกระเพาะหมักของโค แกะ และแพะ ได้แบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas aeruginosa* 9.0% *Bacillus* 37.8 % *Micrococus* 8.1% และ *Streptococcus* 44.3% โดยแบคทีเรียทีแยกได้มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้

2.4.2 โปรโตซัว (Protozoa)

โปรโตซัวที่อยู่ในกระเพาะรูเมนจะเป็นพวกที่อยู่ในสภาพไร้ออกซิเจน (ฉลอง วชิราภากร. 2541) มีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรีย มีจำนวนประมาณ 1ล้านตัวต่อ มล. (10^6/ml) ในสัตว์เคี้ยวเอื้องที่โตเต็มที่โปรโตซัวมักเป็นพวก ciliates คือมีขนเล็กๆรอบตัว มี 2family ใหญ่ๆคือ

1. Isotrichidae หรือที่เรียกว่า Holotrichs แบ่งออกเป็น 2 genera คือ Isotricha และ Dasytricha

2. Ophryoscolecidae หรือ Oligotrichs มีหลาย species ซึ่งมีรูปร่างและขนาดต่างๆกันอยู่ใน genera Entodinium, Diplodinium, Epidinium และ Ophryocolex (บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2541)

2.4.3 เชื้อรา (Fungi)

เชื้อราต้องการสภาพไร้ออกซิเจนอย่างมาก (strictly anaerobe) และอาจมีปริมาณถึง 8% ของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด คาดว่ามันสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยพันธะระหว่างเฮมิเซลลูโลสและลิกนินได้ ซึ่งนับว่าเป็นข้อดีเพราะทำให้เยื่อใยในพืชสามารถใช้ให้เป็นประโยชน์ได้มากขึ้น นอกจากนี้การที่มันมีไรซอยด์ (rhizoid) ซึ่งมีหน้าที่คล้ายรากไม้ แทงทะลุเข้าไปในผนังเซลล์ของพืช จะทำให้พันธะของเยื่อใยแตกออก แบคทีเรียสามารถเข้าย่อยได้ดีขึ้น (บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2541)

2.5 เอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนส

นับตั้งแต่ช่วงปลายปี 1980 เอนไซม์ได้เป็นส่วนสำคัญในการช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ปศุสัตว์การใช้เอนไซม์เสริมโดยเฉพาะ polysaccharidase ที่ไม่ใช่แป้งและ phytase เป็นที่แพร่หลายในสัตว์ปีก และในอาหารสุกร อาหารมีพืชเป็นองค์ประกอบทำให้ประสิทธิภาพการย่อยต่ำ (Schedle *et al.* 2012) และกรดไฟติก (Abudabos .2012) นอกจากนี้เอนไซม์มีส่วนช่วยลดอาการท้องร่วงของสุกรเพราะการเสริมเอนไซม์จะช่วยย่อยผนังเซลล์ ที่เป็นส่วนประกอบ ของวัตถุดิบอาหารสัตว์ ช่วยให้สัตว์สามารถใช้ประโยชน์จากสารอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Tapingkae *et al.* 2008) ยังพบว่าไก่เนื้อที่ได้รับการเสริมเอนไซม์ในอาหาร มีน้ำหนักตัวและประสิทธิภาพการใช้อาหารสูงเทียบเท่ากับไก่เนื้อที่ได้รับ AGP อีกทั้งความหนืดของอาหาร (viscosity) ภายในทางเดินอาหารของไก่เนื้อที่ได้รับเอนไซม์จะน้อยกว่าไก่เนื้อที่ได้รับ AGP ทำให้วิลไลสามารถดูดซึมสารอาหารได้ดีกว่า (Owens *et al.* 2008)

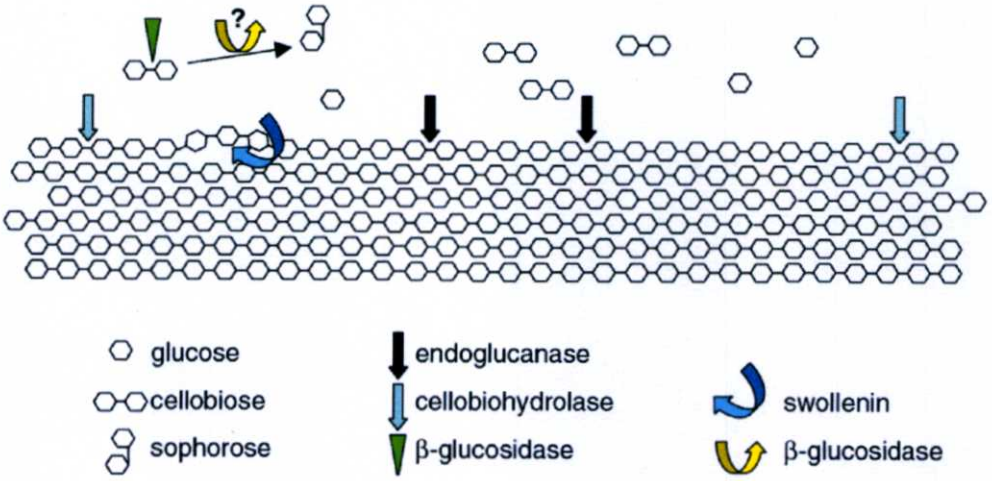
เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่กระตุ้นปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะ ß -1,4-glucosidic ของโครงสร้างเซลลูโลส ซึ่งให้เป็นน้ำตาลกลูโคส เอนไซม์เซลลูเลสเกิดจากการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์โดยจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตบนส่วนประกอบที่มีเซลลูโลสเอนไซม์เซลลูเลสจำแนกออกตามกิจกรรมการทำงานได้ 3 กลุ่ม คือ

1. endoglucanase (1, 4- ß -D-glucan-4-glucanohydrolase) จะย่อยสลายเซลลูโลสไปเป็นกลูโคสเซลโลไบโอสและโอลิโกแซคคาไรด์โดยจะย่อยสลายด้านในของสายเซลลูโลสแบบสุ่ม

2. exoglucanase (1, 4- ß -D-glucan glucohydrolase) จะย่อยเซลลูโลสและโอลิโกแซคคาไรด์ไปเป็นเซลโลไบโอสโดยจะย่อยสลายด้านปลายของสายเซลลูโลส

3. ß -glucosidase (ß -d-glucosideglucohydrolase) จะย่อยสลายเซลลูไบโอสไปเป็นกลูโคส (สุริยะ สะวานนท์ .2551)

ไซแลนเนสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายโครงสร้างของไซแลนซึ่งเป็นโพลิเมอร์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ ß -1,4-D-xylopyranosyl โดยมีหมู่อะราบิโนซิล (arabinosyl) กลูคูโรนิล (glucoronyl) หรืออะซิติล (acetyl) โดยเชื่อมต่อด้านข้างของไซโลสโดยหมู่อะราบิโนสต่อกับตำแหน่ง*O*-3 ของไซโลสหมู่กลูคูโรนิลต่อกับตำแหน่ง *O*-2 ของไซโลสส่วนหมู่อะซิติลต่อกับตำแหน่ง *O*-3 และ *O*-2 ของไซโลส (ภาพที่ 2.5)



ภาพที่ 2.5 ปฏิกิริยาของระบบเอนไซม์เซลลูเลส (Alonso *et al.* 2011)

เอนไซม์ไซแลนเนสแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ

1. endo-xylanase หรือ 1,4- ß -D-xylan- xylanohydrolase, EC 3.2.1.8 เอนไซม์ชนิดนี้จะย่อยสลายพันธะ 1,4- ß -D-xylan xylodic แบบสุ่มได้ไซโลสและโอลิโลแซ็กคาไรด์สายสั้นๆเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Agbor *et al.* 2011)

2. ß -xylosidase หรือ 1,4- ß -xylan-xylanohydrolase, EC 3.2.1.37 เอนไซม์ชนิดนี้จะย่อยสลายพันธะ 1,4- ß -D-xylan- xylopyranose ทีละ 1 หน่วยจากปลายด้านนอกรีดิวซ์ (non-reducing end) ได้ไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Dekker and Richard. 1976)

2.6 การใช้เอนไซม์ปรับปรุงการย่อยได้ของโภชนะในสัตว์ปีก

Tufarelli *et al.* (2007) ได้ศึกษาการเสริมเอนไซม์ไซแลนเนสและขนาดของอนุภาคที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพของไก่เนื้อขนดำจุดขาว ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีข้าวสาลีพบว่าการเสริมเอนไซม์ไซแลนเนสในอาหารที่มาจากข้าวสาลีทำให้ละเอียดจะช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตของไก่เนื้อขนดำจุดขาว

นอกจากนี้ก็ยังมีการศึกษาเอนไซม์โดยนำไปใส่ในอาหารไก่กระทงโดยผสมในสูตรอาหาร เอนไซม์ ที่ใช้ได้แก่ เอนไซม์เบต้า-กลูคาเนส (ß-glucanase) เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) เอนไซม์เฮมิเซลลูเลส (hemicellulase) เอนไซม์ไฟเตส (phytase) เอนไซม์โปรตีเอส (protease) และสารปรุงแต่งอาหารสัตว์พบว่าการใช้เอนไซม์ในอาหารของสัตว์ช่วยปรับปรุงการย่อยให้ดีขึ้น มีเนื้อเพิ่มขึ้น (Lü *et al.* 2009)

Abudabos, A. (2010) ได้ทำการศึกษาผลของการเสริมเอนไซม์ทางการค้า Bergazyme P ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์เบต้า-เพนโตซาเนส (ß-pentosanase), แอลฟา-อะไมเลส (α-amylase), กลูคาเนส (glucanases) และกาแลคโตแมนเนส (galactomannases) ด้วยการผสมในอาหารสัตว์ในสัดส่วนข้าวโพด-กากถั่วเหลืองตามมาตรฐานอาหารที่เลี้ยงไก่กระทงอายุ 1-49 วัน ใช้ไก่พันธุ์ Cobb 500 จากฟาร์มเชิงพาณิชย์ (commercial hatchery) อายุ 1 วันจำนวน 800 ตัว โดยแต่ละทรีตเมนต์มี 4 ซ้ำการทดลอง แบ่งไก่ออกเป็น 3 กลุ่มตามสูตรอาหาร ดังนี้ สูตร T1: อาหารข้าวโพด-กากถั่วเหลืองไม่เสริมเอนไซม์ (สูตรควบคุม), สูตร T2: T1+Bergazyme P/t 250 g และสูตร T3: T1+Bergazyme P/t 500 g วิเคราะห์ผลของแต่ละทรีตเมนต์โดยใช้ ANOVA อาหารที่เสริมด้วยเอนไซม์ช่วยให้น้ำหนักตัวไก่อายุ 42 และ 49 วันเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และไก่อายุ 49 วันพบว่ามีเนื้ออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งกล่าวได้ว่า Bergazyme เป็นตัวช่วยปรับปรุงเพื่อเพิ่มน้ำหนักกล้ามเนื้อไก่ โดยในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร T2 และสูตร T3 พบค่าความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดจากซีรั่มมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อไก่อายุ 21 และ 49 วัน ค่าความสามารถของโปรตีนจากลำไส้อิเลี่ยมในการถูกย่อยสลายจากอาหารสูตร T2 มีค่าสูงกว่าสูตรควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ผลจากงานวิจัยนี้พบว่าการเสริมเอนไซม์ Bergazyme P ปริมาณ 250 g/t ผสมในอาหารสัตว์เป็นการเพิ่มสมรรถภาพการผลิตไก่ จากการพบระดับความสามารถย่อยโปรตีนที่มีค่าค่อนข้างสูง

Sharmila *et al.* (2014) ศึกษาผลของการเสริมเอนไซม์ไซแลนเนสและเอนไซม์เซลลูเลสในอาหารที่มีกากเนื้อเมล็ดปาล์มน้ำมัน (PKM) เป็นองค์ประกอบหลักต่อสมรรถภาพการเจริญ สุ่มไก่พันธุ์ Cobb เพศผู้ อายุ 75 วัน แบ่งเป็น 3 กลุ่มตามสูตรอาหาร ได้แก่ สูตร T1 (PKM 20% ปราศจากการเสริมด้วยเอนไซม์), สูตร T2 (PKM 20% เสริมด้วยเอนไซม์ไซแลนเนส) และสูตร T3 (PKM 20% เสริมด้วยเอนไซม์เซลลูเลส) โดยเสริมเอนไซม์แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 200 U/kg of feed บันทึกน้ำหนักตัวและอัตราการกินอาหารทุกสัปดาห์ โดยไก่ทั้งหมดเมื่ออายุ 35 วันจะถูกนำไปฆ่าและเก็บลำไส้ส่วนต้นด้วยเทคนิคปลอดเชื้อเพื่อวิเคราะห์ปริมาณ VFAs และนับประชากรแบคทีเรีย การเสริมด้วยเอนไซม์ไซแลนเนสและเอนไซม์เซลลูเลสในอาหาร PKM พบผลต่อสมรรถภาพการเจริญ, จำนวนประชากรแบคทีเรียในลำไส้ส่วนต้น และปริมาณ VFAs ที่แตกต่างกัน โดยพบว่า PKM ที่เสริมด้วยเอนไซม์เซลลูเลสช่วยลดการสะสมอาหารได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ PKM ที่เสริมด้วยเอนไซม์ไซแลนเนส และอาหาร PKM ที่ปราศจากการเสริมด้วยเอนไซม์ ซึ่งน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นและอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก (FCR) สะสมในแต่ละทรีตเมนต์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ผลของการเสริมด้วยเอนไซม์ไซแลนเนสและเอนไซม์เซลลูเลสต่อการเจริญของไก่กระทง มีความสัมพันธ์ของอัตราการกินอาหารที่มากขึ้นและช่วยลดจำนวนประชากรแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ส่วนต้น ซึ่งอาหารที่เสริมด้วยเอนไซม์ไซแลนเนสมีประโยชน์ช่วยให้ไก่กระทงเพิ่มการสะสมการกินอาหาร มีน้ำหนัก และ FCR สูงขึ้น

Shirmohammad *et al.* (2011) ทำการศึกษา ทดลองเพื่อศึกษาผลของการเสริมด้วยเอนไซม์ REAP®ในอาหารข้าวโพด-ถั่วเหลืองต่อการใช้พลังงานของลูกไก่และผลต่อสมรรถภาพของไก่กระทง ในการทดลองที่ 1: ใช้ไก่ตัวผู้ พันธุ์อีซ่า-บราวน์ (Isa-Brown) อายุ 50 สัปดาห์ จำนวน 16 ตัว แบ่งเป็น 4 กลุ่ม การทดลองซ้ำละ 4 ตัว และให้อาหารที่มีค่าพลังงาน 2 ระดับ (2650 และ 1759 kcal TME_n/kg diet) ผสมกับเอนไซม์ REAP® ความเข้มข้น 0 และ 0.1% เพื่อศึกษาค่าพลังงานที่ใช้ประโยชน์ได้ (AME) สำหรับการทดลองที่ 2: แบ่งไก่เพศผู้พันธุ์รอส (Ross) อายุ 3 วัน จำนวน 360 ตัว ออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ซ้ำการทดลอง การทดลองละ 30 ตัว เพื่อศึกษาผลของการใช้อาหารที่มีค่าพลังงาน 2 ระดับ (3100 และ 2980 kcal TME_n/kg diet) ผสมกับเอนไซม์ REAP® ความเข้มข้น 0 และ 0.1% เมื่อไก่ได้รับอาหารไป 28 วันพบว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีพลังงานระดับสูง มีค่า AME สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีพลังงานต่ำอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) น้ำหนักตัวของไก่ที่ได้รับอาหารที่มีระดับพลังงานต่ำที่เสริมด้วย REAP® ความเข้มข้น 0% มีค่าต่ำกว่ากลุ่มอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ

($p<0.05$) จากการทดลองในทุกทรีตเมนต์ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของอัตราการกินอาหารและอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก สำหรับน้ำหนักกล้ามเนื้ออกของไก่ที่ได้รับอาหารที่มีพลังงานต่ำมีค่าสูงกว่าอาหารที่มีพลังงานสูง และไก่ที่ได้รับอาหารที่มีพลังงานต่ำที่เสริมด้วย REAP®0.1% มีน้ำหนักกล้ามเนื้ออกสูงที่สุด ($p<0.05$) น้ำหนักที่สัมพันธ์กับไขมันในช่องท้องมีค่าลดลงเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมด้วย REAP® ($p<0.05$) ค่าร้อยละของน้ำหนักลำไส้เล็กดูโอดีนัมของกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีพลังงานสูงมีน้ำหนักสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีพลังงานต่ำ ความยาวของลำไส้เล็ก (cm/100 g BW) ของกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีพลังงานต่ำปราศจากการเสริมด้วย REAP® มีค่าต่ำกว่ากลุ่มอื่นๆ ($p<0.05$) ผลจากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า อาหารสัตว์ที่เสริมด้วย REAP® ช่วยปรับปรุงน้ำหนักร่างกายและลดไขมันในช่องท้อง ดังนั้นอาจสรุปได้ว่าอาหารสัตว์ที่เสริมด้วยเอนไซม์ REAP® ช่วยปรับปรุงคุณค่าสารอาหารของอาหารที่มีข้าวโพด-กากถั่วเหลืองเป็นหลักที่ใช้เลี้ยงไก่กระทง

Iyayi *et al.* (2005) ได้ทำการศึกษา ใช้อาหารจำนวน 3 สูตร ดังนี้ สูตรที่ 1: อาหารเลี้ยงไก่กระทงพื้นฐานที่มีข้าวโพดเป็นหลักซึ่งปราศจากการเสริมเอนไซม์ สูตรที่ 2: กากเบียร์แห้ง (BDG) เสริมเอนไซม์ และสูตรที่ 3: กากเนื้อเมล็ดปาล์มน้ำมัน (PKM) เสริมเอนไซม์ ซึ่งอาหารแต่ละสูตรแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ในงานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตไก่เมื่อได้รับอาหารเสริมเอนไซม์ซึ่งมีเส้นใยสูงเทียบกับอาหารพื้นฐานที่มีข้าวโพดเป็นหลักที่ปราศจากการเสริมด้วยเอนไซม์ พบว่าเมื่อเลี้ยงด้วยอาหาร BDG และ PKM ที่เสริมด้วยเอนไซม์ไก่ในระยะเล็ก (starter phase) มีการเจริญเติบโตและอัตราการกินอาหารสูงอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เมื่อถึงระยะก่อนส่งตลาด (finisher phase) พบอัตราการกินอาหารมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) จากการเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเอนไซม์ แต่การเจริญเติบโตกลับไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ซึ่งอัตราการเปลี่ยนอาหาร (FCR) ของอาหารสูตรที่เสริมเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในไก่ระยะเล็ก แต่เมื่อถึงระยะก่อนส่งตลาดพบการเปลี่ยนอาหารต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) อีกทั้งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ของน้ำหนักโครงไก่ระหว่างการเสริมด้วยเอนไซม์พบน้ำหนักของตับอ่อนเพิ่มขึ้น และน้ำหนักไตของไก่ที่ได้รับอาหารสูตร BDG และ PKM ที่เสริมเอนไซม์มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ค่าความสามารถในการถูกย่อยสลายของโปรตีนหยาบ (crude protein), ไขมันรวม (crude fat) และเส้นใย (crude fibre) กลับมีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เมื่อให้อาหารเสริมด้วยเอนไซม์ จากการพิจารณาต้นทุนอาหารต่อกิโลกรัมของอาหารที่

เสริมเอนไซม์พบมีค่าต่ำเพียงในไก่ระยะเล็กเท่านั้น แต่เมื่อไก่ถึงระยะก่อนส่งตลาดกลับพบว่าการเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเอนไซม์ไม่ได้มีประโยชน์ในแง่ของต้นทุนอาหาร ซึ่งในการเสริมด้วยเอนไซม์ผสมในอาหารพบว่าช่วยลดปริมาณความต้องการข้าวโพดในอาหารไก่ในระยะเล็กและระยะก่อนส่งตลาดกว่า 31% และ 52% ตามลำดับ

Meng and Slominki (2005) รายงานว่า การเสริมเอนไซม์ไซลาเนสร่วมกับเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) สามารถย่อยเยื่อใยในกากเมล็ดทานตะวัน รำสกัดน้ำมัน และอาหารไก่เนื้อได้ดี ส่วนในกากถั่วเหลืองพบว่า เอนไซม์เพคติเนสจะให้ผลการย่อยเยื่อใยได้ดีที่สุดแต่อย่างไรก็ตามการเสริมเอนไซม์ไซลาเนส เซลลูเลส และเพคติเนสร่วมกันน่าจะส่งผลที่ดีที่สุด

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อาหารที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

1. Peptone 0.1%
2. Lubia-Bertani agar (LB agar)
3. Carboxymethyl cellulose agar (CMC agar)
4. Xylan agar
5. LB broth
6. CMC broth
7. Xylan broth

3.1.2 สารเคมี

1. Carboxymethycellulose (Fluka, Germany)
2. Cellobiose (Sigma,Germany)
3. Glucose (Merk , Germany)
4. Peptone (Merck, Germany)
5. แคลเซียมคาร์บอเนต (ScharlauChemie S.A., Spain)
6. โซเดียมคลอไรด์ (Ajax Finechem, Australia)
7. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Ajax Finechem, Australia)
8. กรดไฮโดรคลอริค (Merck, Germany)
9. แอลกอฮอล์ 70% และ 95%
10. 25 mM แมคนีเซียมคลอไรด์ (Vivantis, Malaysia)
11. Phenol (Sigma, USA)
12. Chloroform (Merck, Germany)
13. Sucrose (Bio Basic Inc., U.S.A.)
14. Ethanol (Merck, Germany)
15. Sodium chloride (NaCl) (Merck, Germany)
16. Xylan from Birchwood (Sigma,U.S.A.)
17. Decahydronapthalene

18. Acetone

19. Sodium sulphite

20. สารละลาย Netural detergent

3.1.3 เครื่องมือ

1. ตู้เขี่ยเชื้อ (DWYER instruments INC, U.S.A.)

3. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave Tomy, Japan)

4. ตู้อบเครื่องแก้ว (Hot air oven: Memmert, Belgium)

5. เครื่องผสมสารละลายในหลอดทดลอง (Vortex Mixer KMC - 1300V; Vision,Korea)

6. เครื่องเขย่า (Shaking Incubator: Vision VS - 8408 SFN, Korea)

7. เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter: EUTECH PC 510, Singapore)

8. เครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ (Spectophotometer, Ultrospec 1100 *pro*, England)

9. ตู้แช่แข็ง - 20°C

10. ไมโครเวฟ

11. ไมโครปิเปต

12. เครื่องแก้วพร้อมอุปกรณ์อื่นๆที่จำเป็น

13. ชุดเครื่องย่อยพร้อมด้วยบีกเกอร์ทรงกระบอกสูงขนาด 600 ml

14. เตาไฟฟ้า (Hot plate)

15. Fritted glass crucible ขนาด 50 ml ที่มี porosity ขนาด 40-90 microns (P2)

16. Funnel

17. เตาเผา (muffle Furnace)

18. filtering device พร้อม filtering flask ขนาด 1000 ml

19. โหลดูดความชื้นและตู้อบ

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 แบคทีเรีย

ใช้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก มานิสา บุพตา (2555) โดยเชื้อที่ใช้ในการศึกษามี 2 ไอโซเลท คือ ID2R1P1 และ ID2R1P2 ที่คัดแยกจากกระเพาะรูเมนกระบือ พบว่า ไอโซเลท ทั้ง 2 มีความสามารถในการย่อยบนอาหารแข็ง CMC agar และ xylan agar ไอโซเลท ID2R1P2 มีค่า HC (4.27±0.47) ของเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุด และเอนไซม์ไซแลนเนส มีค่า

HC สูงที่สุดเช่นกัน (4.00±0.02) ส่วนไอโซเลท ID2R1P1 มีค่า HC (2.53±0.37) ของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซแลนเนส มีค่า HC (2.09±0.13) และได้ทำการศึกษาการเพิ่มปริมาณชิ้นยีน 16s rDNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าไอโซเลท ID2R1P2 พบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสมีความเหมือนกับเชื้อ *B. pumilus* (EU234500.1) ซึ่งมีความเหมือน 96 % ไอโซเลท ID2R1P1 พบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนส มีความเหมือนกับเชื้อ *Corynebacterium* sp. (X89778.1) ซึ่งมีความเหมือน 99% ไอโซเลท ID2R1P2 ได้มีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อและทดสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์แล้วคือ ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจะเลี้ยงในอาหาร CMC broth ที่ความเข้มข้น CMC 3% และ yeast extract 0.1% บ่มที่อุณหภูมิ 39°C pH 5.0 เป็นเวลา 5 วัน และผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจะเลี้ยงในอาหาร xylan broth ที่ความเข้มข้นไซแลน 1% และ yeast extract 0.1% บ่มที่อุณหภูมิ 39°C pH 5.0 เป็นเวลา 3 วัน และจากการทำปัญหาพิเศษเรื่องสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ ID2R1P1 ที่จำแนกจากกระเพาะหมักของกระบือเพื่อผลิตเซลลูเลส ทิภาภรณ์ งามสง่า (2557) พบว่าสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงไอโซเลท ID2R1P1 เพื่อให้ผลิตเอนไซม์สูง คือ เลี้ยงในอาหาร CMC broth ที่ความเข้มข้น CMC 1% และ yeast extract 0.1% เป็นระยะเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 39 °C pH 7.0 การศึกษาครั้งนี้จึงได้นำไอโซเลท ID2R1P1 มาศึกษาเพื่อทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์

3.2.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่จะทดสอบ

นำเชื้อแบคทีเรีย ID2R1P1 ที่ให้ผลผลิตเอนไซม์สูงสุดบนอาหารแข็งมาเลี้ยงบน Lubia-Bertani agar บ่มอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงใน Lubia-Bertani broth บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm เพื่อตรวจสอบปริมาณเชื้อเริ่มต้นและทำการเลี้ยงในอาหาร CMC broth ที่ความเข้มข้น CMC 1% และ yeast extract 0.1% เป็นระยะเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 39 °C pH 7.0

3.2.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของ crude enzyme

3.2.3.1 การเตรียมสารสกัดเอนไซม์

นำเชื้อแบคทีเรียข้อ 3.2.1 มาเลี้ยงบน Lubia-Bertani agar บ่มอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงใน Lubia-Bertani broth บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm เพื่อตรวจสอบปริมาณเชื้อเริ่มต้น จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหาร CMC broth ที่ความเข้มข้น CMC 1% และ yeast extract 0.1% เป็นระยะเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 39 °C pH 7.0 เขย่าด้วยความเร็วรอบ 230 rpm นำอาหารที่เพาะเลี้ยงแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่

แยกได้มาจากตัวอย่างน้ำหมักที่ได้มาแยกเซลล์ โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที แยกเก็บส่วนใส (crude enzyme)

3.2.3.2 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (optimal time)

ทดสอบเวลาที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ โดยบ่ม crude enzyme กับสับสเตรท โดยเตรียมสารละลาย CMC ความเข้มข้น 1% และสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตรต pH 6.0 สำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 300 µl บ่มกับ crude enzyme 100 µl เป็นเวลา 5 ,10, 15 และ 20 นาที ที่อุณหภูมิ 37 °C สำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้ วิธี DNS method (Miller. 1959) และหาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford (1976)

3.2.3.3 การศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (optimal pH)

ทดสอบความเป็นกรดด่าง (pH) ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ โดยบ่มเอนไซม์กับสับสเตรท CMC ที่ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 M ที่มีค่า pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 ตามลำดับ โดย pH 3.0-6.0 ใช้สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตรต และpH 7.0-10.0 ใช้สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต โดยเตรียมสารละลาย CMC ความเข้มข้น 1% ที่ pH 3.0-10.0 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 M 300 µl บ่มกับ crude enzyme 100 µl ที่อุณหภูมิ 37 °C (Shankar *et al.* 2011) แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้ วิธี DNS method (Miller. 1959) และหาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford (1976)

3.2.3.4 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (optimal temperature)

ทดสอบอุณหภูมิ ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ โดยบ่มเอนไซม์กับสับสเตรท CMC ที่ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 M ที่มีค่า pH ที่เหมาะสม บ่มที่อุณหภูมิ 30-90 °C แล้ววิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้ วิธี DNS method (Miller. 1959) และหาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford (1976)

3.2.3.5 การวิเคราะห์การย่อยสลายสับสเตรทของเอนไซม์ (substrate specificity)

การศึกษาความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยสับสเตรท สับสเตรททั่วไปที่งานวิจัยใช้ตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ได้แก่ avicel 1% เปรียบเทียบกับกลูโคสมาตรฐาน xylan 1% เปรียบเทียบกับไซโลสมาตรฐาน CMC 1% เปรียบเทียบกับกลูโคสมาตรฐาน และ filter paper เปรียบเทียบกับกลูโคสมาตรฐาน ในสภาวะที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุด แล้วทำการ

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้ วิธี DNS method (Miller. 1959) และหาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford (1976)

3.2.4. การเตรียมตัวอย่างวัตถุดิบอาหารสัตว์

3.2.4.1. รำข้าว ซื้อมาจากตลาด เขตลาดกระบัง กทม.

3.2.4.2. กากถั่วเหลือง จ. นครปฐม

3.2.4.3. ข้าวโพดบดหยาบ จ. นครปฐม

3.2.4.4. มันสำปะหลัง จ. นครปฐม

3.2.4.5. อาหารไก่สำเร็จรูปชนิดเม็ด (เบทาโกร 204) สำหรับไก่เนื้ออายุเกิน 3-6 สัปดาห์ประกอบด้วย โปรตีนไม่น้อยกว่า 19% ไขมันไม่น้อยกว่า 9% กากไม่มากกว่า 5% ความชื้นไม่มากกว่า 13%

ตารางที่ 3.1 สูตรอาหารไก่เนื้อ เบทาโกร 204

องค์ประกอบทางเคมี (%)	เบทาโกร 204
โปรตีน	19
ไขมัน	9
กาก	5
ความชื้น	13

3.2.5 การศึกษาการย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์

นำตัวอย่างอาหารไก่เนื้อเบทาโกร 204 สำเร็จรูป รำข้าว กากถั่วเหลือง ข้าวโพดบดหยาบ และ มันสำปะหลัง มาปั่นให้เล็กลงด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ ล้างน้ำตาลออกด้วยน้ำกลั่น กรองน้ำทิ้ง แล้วอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 24 ชั่วโมง ทำการศึกษาความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์ คือ รำข้าว กากถั่วเหลือง ข้าวโพด และมันสำปะหลัง 2% ในสภาวะที่

เอนไซม์ทำงานดีที่สุดเป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้ วิธี DNS method (Miller. 1959) และหาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford (1976) และนำอาหารไก่สำเร็จรูปมาทำการย่อยตามที่ดัดแปลงจาก Wu *et al.* (2004) โดยการจำลองสภาวะในกระเพาะอาหารไก่โดยบ่ม crude enzyme 20 ยูนิต กับอาหารสัตว์สำเร็จรูป 2% ที่สภาวะที่เหมาะสม เมื่อครบเวลาเติม 1 M HCL และ pepsin 3000 ยูนิต บ่มต่อที่อุณหภูมิ 40 °C เติม pancreatin ที่ละลายในโซเดียมไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 1 M หยุดปฏิกิริยาบนน้ำแข็งนำตัวอย่างที่ได้ละลายในบัฟเฟอร์ pH 6 แล้วกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 แยกเก็บตะกอนไปวิเคราะห์น้ำหนักแห้งและเยื่อใยของพืช ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ตามวิธีของ Van Soest (Van Soest *et al.* 1991)

3.2.6 การวิเคราะห์เยื่อใยวิธี Detergent method (Van Soest *et al.* 1991)

3.2.6.1 การวิเคราะห์หา NDF (Neutral detergent fiber)

ชั่ง celite 1 กรัม ใส่ลงใน Fritted glass crucible จากนั้นนำไปอบที่ 100 °C 1 ชั่วโมง แล้วนำ glass crucible ไปใส่โหลดูดความชื้นรอเย็นเท่าอุณหภูมิห้อง จากนั้นชั่งน้ำหนัก glass crucible และชั่งตะกอนอาหารไก่สำเร็จรูปบดละเอียดที่ได้จากข้อ 3.2.5 ปริมาณ 0.5 – 10 กรัม ใส่บีกเกอร์กระบอกสูง แล้วใส่สารเคมี neutral detergent, Decahydronapthalene และ Sodium sulfite ต้มให้เดือดภายใน 5-10 นาที แล้วจับเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมากรองโดยใช้ Fritted glass crucible ที่เตรียมไว้ นำ Fritted glass crucible ไปวางบน Filtering flask ที่ต่อกับ suction pump เปิดวาวล์ดูดอากาศออกจากขวดกรองช้าๆ และล้างด้วยน้ำกลั่นร้อน โดยใช้น้ำให้น้อยที่สุด และล้างด้วย acetone 2 ครั้ง ดูดให้ตะกอนแห้งและหมดกลิ่น acetone แล้วนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 8 ชั่วโมงหรือค้างตลอดคืน ทิ้งให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก และไปคำนวณหาปริมาณ NDF

$$\%NDF = \frac{A - B}{S} * 100$$

A = น้ำหนัก crucible + NDF

B = น้ำหนัก crucible แห้ง

S = น้ำหนักตัวอย่าง

3.2.6.2 การวิเคราะห์หา ADF (Acid detergent fiber)

ชั่ง celite 1 กรัม ใส่ลงใน Fritted glass crucible จากนั้นนำไปอบที่ 100 °C 1 ชั่วโมง แล้วนำ glass crucible ไปใส่โหลดูดความชื้นรอเย็นเท่าอุณหภูมิห้อง จากนั้นชั่งน้ำหนัก glass crucible และชั่งตะกอนอาหารไก่สำเร็จรูปบดละเอียดที่ได้จากข้อ 3.2.5 ปริมาณ 1 กรัมใส่บีกเกอร์กระบอกสูง แล้วใส่สารเคมี acid detergent และ Decahydronapthalene ต้มให้เดือดภายใน 5-10 นาที แล้วจับเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมากรองโดยใช้ Fritted glass crucible ที่เตรียมไว้ นำ

Fritted glass crucible ไปวางบน Filtering flask ที่ต่อกับ suction pump เปิดวาวล์ดูดอากาศออกจากขวดกรองช้าๆ และล้างด้วยน้ำกลั่นร้อน โดยใช้น้ำให้น้อยที่สุด และล้างด้วย acetone 2 ครั้ง ดูดให้ตะกอนแห้งและหมดกลิ่น acetone แล้วนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 8 ชั่วโมงหรือค้างตลอดคืน ทิ้งให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนักภายใน 30 นาที และไปคำนวณหาปริมาณ ADF

$$\%ADF = \frac{D - B}{S} * 100$$

B = น้ำหนัก crucible

D = น้ำหนัก crucible + ADF

S = น้ำหนักตัวอย่าง

% hemicellulose = %NDF - %ADF

3.2.6.3 วิเคราะห์หา lignin

ใช้กากที่เหลือจากการวิเคราะห์ ADF ในขั้นต้น นำ crucible ที่มี ADF อยู่มาวางใน beaker และนำ beaker ไปวางบนถาด เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 72% ที่แช่เย็นประมาณ 15 °C ลงไปใน crucible ให้ท่วม ADF พร้อมกับคนด้วยแท่งแก้วเพื่อให้ตะกอนแตกละเอียดนุ่มดี แล้วเติมกรดกำมะถันลงไปอีกครึ่งหนึ่งของการเติมครั้งแรกพร้อมกับคนให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ให้กรดไหลออกจาก crucible ขณะที่ตั้งให้คนตะกอนเสมอเป็นครั้งคราวนาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 20-23 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำ crucible มากรองตะกอน โดยนำไปวางบน Filtering flask ที่ต่อกับ suction pump เปิดวาวล์ดูดอากาศออกจากขวดกรองช้าๆ และล้างด้วยน้ำกลั่นร้อนหลายๆครั้งจนหมดกรด แล้วนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 8 ชั่วโมงหรือค้างตลอดคืน ทิ้งให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก แล้วนำไปเผาที่อุณหภูมิ 500 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมงทิ้งให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก และไปคำนวณค่า

3.2.7 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีน

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนวิธีของ Bradford (1976) นำ crude enzyme ของไอโซเลท ID2R1P1 (ข้อ 3.2.1) 20 µl ผสมในน้ำยาวัดโปรตีน (Bio-Rad) 1 ml เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลาย โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve) ของ bovine serum albumin (BSA) เพื่อนำไปคำนวณ

3.2.8 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

นำ crude enzyme ของไอโซเลท ID2R1P1 (ข้อ 3.2.3.1) ไปวัดการทำงานของเอนไซม์ซึ่งการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ปริมาตรของปฏิกิริยาทั้งหมด 1 ml โดยเตรียมชุดทดลอง 3 ชุด คือ

ชุดที่ 1 ประกอบด้วย หลอดที่มีน้ำกลั่น 100 µl ที่มี CMC และสารละลายไซแลนความเข้มข้น 1% ใน 0.01 M citrate buffer pH 6.0 และpH 8.0 ปริมาตร 300 µl (substrate control; SC)

ชุดที่ 2 ประกอบด้วย หลอดที่มี crude enzyme 100 µl ที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 300 µl (enzyme control; EC)

ชุดที่ 3 ประกอบด้วย หลอดที่มี crude enzyme 300 µl ที่มี CMC และสารละลายไซแลนความเข้มข้น 1% ใน 0.01 M citrate buffer pH 6.0 และpH 8.0 ปริมาตร 300 µl (enzyme substrate test; ES)

นำไปบ่มในเครื่องควบคุม (heat box) ที่อุณหภูมิ 37°C สำหรับการศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสและ 50°C สำหรับการศึกษาเอนไซม์ไซแลนเนส เป็นเวลา 10 นาที เติม 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) ปริมาตร 600 µl เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มที่ 95°C เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้หายร้อน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm นำค่า OD จากชุดการทดลองชุดที่ 3 (ES) ที่วัดได้ลบด้วยค่าการดูดกลืนแสงของ OD จากชุดการทดลองชุดที่ 2 (EC) และ OD จากชุดการทดลองชุดที่ 1 (SC) (ODES- ODEC- ODSC) จากนั้นนำค่า OD นี้ไปเทียบกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ข) เพื่อนำไปคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) และ specific activity และคำนวณค่าฤทธิ์สัมพันธ์ (relative activity) เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ในรูปร้อยละกิจกรรมที่เหลืออยู่โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่มีค่าสูงที่สุดคิดเป็น 100%

กำหนดให้กิจกรรมของเอนไซม์(enzyme activity) 1 Unit หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลาย CMC หรือ xylan ให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่เทียบค่ากับน้ำตาลรีดิวส์ที่ถูกปลดปล่อยออกมา 1 µMole ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด (Alves-Prado et al. 2010)

Enzyme activity (U/ml)

$$= \frac{\text{µMole ของน้ำตาล reducing sugar ที่คำนวณได้ x dilution factor}}{\text{เวลาที่บ่ม (min) x ปริมาตรเอนไซม์ที่ใส่ (ml)}}$$

Specific activity (U/mg)

$$= \frac{\text{µMole ของน้ำตาล reducing sugar ที่คำนวณได้ x dilution factor}}{\text{ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml) x ปริมาตรเอนไซม์ที่ใส่ (ml) x เวลาที่บ่ม (min)}}$$

บทที่4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 สมบัติการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

เพื่อให้ทราบถึงคุณสมบัติการทำงานของเอนไซม์ที่ผลิตได้จากไอโซเลท ID2R1P1 ที่คัดแยกจากกระเพาะรูเมนกระบือ จึงต้องทำการศึกษาระยะเวลาในการบ่ม pH และอุณหภูมิที่เอนไซม์จะทำงานได้ประสิทธิภาพสูงที่สุดและชนิดของสับสเตรตต่างๆที่เอนไซม์สามารถย่อยได้ โดยนำแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P1เลี้ยงในอาหาร CMC broth ที่ความเข้มข้น CMC 1% และ yeast extract 0.1% เป็นระยะเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 39 °C pH 7.0 เขย่าด้วยความเร็วรอบ 230 rpmนำอาหารที่เพาะเลี้ยงแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้มาจากตัวอย่างน้ำหมักที่ได้มาแยกเซลล์ โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที แยกเก็บส่วนใส (crude enzyme)โดยนำ crude enzyme ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อมาศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์

4.1.1 ผลของเวลาที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

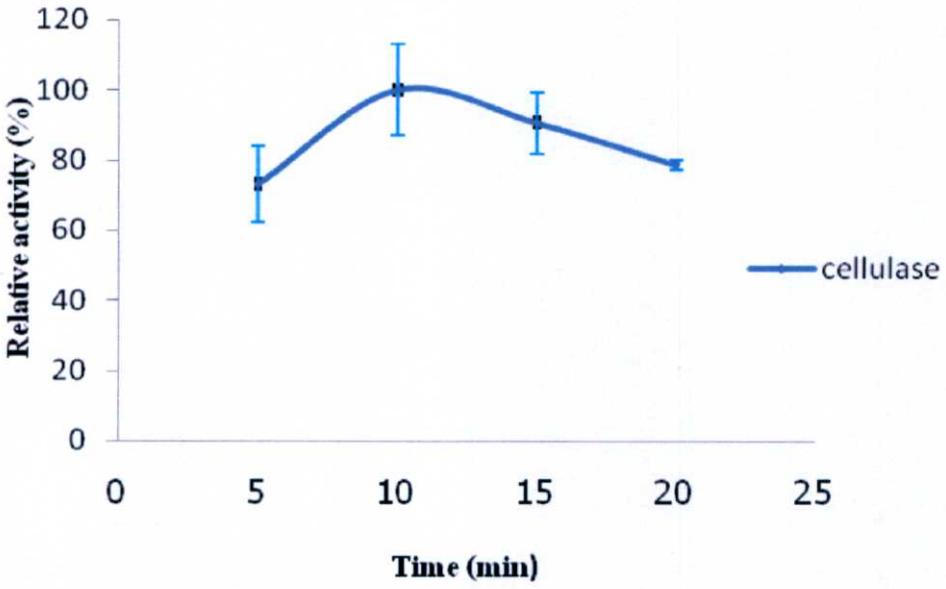
ทดสอบการทำงานของ crude enzyme ที่เวลา 5, 10, 15, 20 นาทีพบว่าเอนไซม์ที่สกัดจากแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P1 แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดหลังจากบ่มนาน 10 นาที โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 17.41±0.03 $U.mg^{-1}$(100%) ดังตารางที่ 4.1 และเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบ่มปฏิกิริยาเอนไซม์นานขึ้นพบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็ว (ภาพที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (crude enzyme) เมื่อใช้เวลาที่ต่างกัน

Time (min)	Specific activity[a,b] (U/mg protein)	Relative activity (%)
5	12.72±0.01	73
10	17.41±0.03	100
15	15.79±0.02	91
20	13.71±0.01	79

หมายเหตุ[a)]ค่าเฉลี่ยการทดลอง 3 ครั้ง

[b)] Specific activity (U/mg protein) = $\frac{\text{µMole ของน้ำตาล reducing sugar ที่คำนวณได้ x dilution factor}}{\text{ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml) x ปริมาตรเอนไซม์ที่ใส่ (ml) x เวลาที่บ่ม (min)}}$



ภาพที่ 4.1 ค่าฤทธิ์สัมพันธ์ของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (100% = 17.407±0.022 $U.mg^{-1}$) ในช่วงเวลาของการบ่ม 5, 10, 15 และ 20 นาที

4.1.2 ผลของความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

เมื่อบ่ม crude enzyme ในสารละลายบัฟเฟอร์pH ต่างกัน คือpH 3.0-10.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที พบว่าที่ระดับ pH 7.0 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสมีค่าสูงสุด

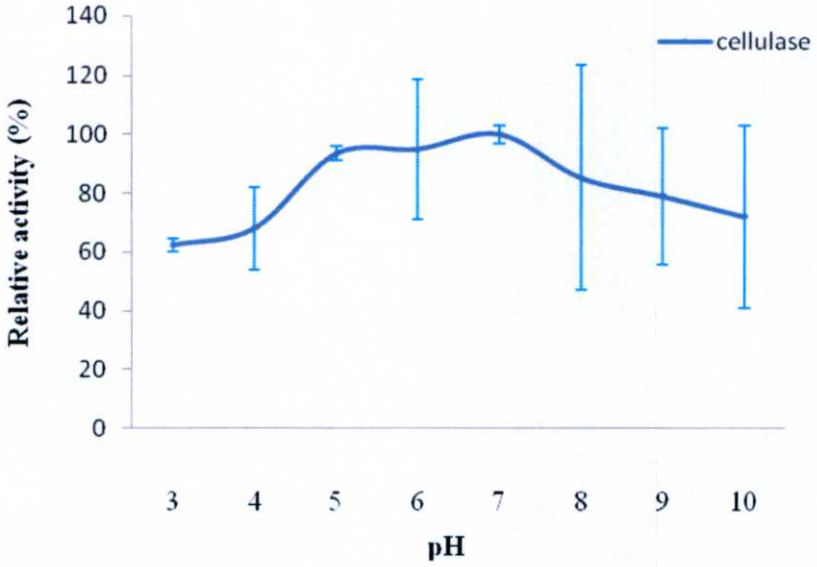
คือ 6.15±0.01U.mg^{-1}(100%) ดังตารางที่ 4.2 (ภาพที่ 4.2) เอนไซม์ ทำงานได้ดีที่สุดที่ pH ค่าหนึ่ง เรียกว่า ค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงาน ณ จุดที่ pH มีค่าสูงหรือต่ำกว่าค่านี้ กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์จะลดลง เอนไซม์ เซลลูเลสจะทำงานได้ดีที่สุดใน pH ช่วง 5.0 ถึง 9.0 เมื่อเพิ่มความเข้ม ข้นของสารตั้งต้น อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะมีค่าสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกและลดช้าลง เมื่อความเข้มข้นของสารตั้งต้นสูงขึ้น จนในที่สุดอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะไม่เพิ่มขึ้นอีก (เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์. 2551) และตามการศึกษามีการใช้งานเซลลูเลสในช่วง pH 6.0- 7.0 ของ *A. Niger* (Akiba *et al.*, 1995).

ตารางที่ 4.2 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเมื่อบ่มที่ระดับ pH 3.0-10.0

pH	Specific activity[a,b] (U/mg protein)	Relative activity (%)
3	3.84±0.00	62
4	4.19±0.01	68
5	5.75±0.01	93
6	5.84±0.05	95
7	6.15±0.00	100
8	5.24±0.03	85
9	4.86±0.02	79
10	4.43±0.01	72

หมายเหตุ [a)] ค่าเฉลี่ยการทดลอง 3 ครั้ง

[b)] Specific activity U/mg protein = $\frac{\text{µMole ของน้ำตาล reducing sugar ที่คำนวณได้ x dilution factor}}{\text{ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml) x ปริมาตรเอนไซม์ที่ใส่ (ml) x เวลาที่บ่ม (min)}}$



ภาพที่ 4.2ค่าฤทธิ์สัมพันธ์ของเอนไซม์เซลลูเลส (100% 6.154±0.003 U.mg^{-1}) เมื่อบ่มที่ระดับ pH 3.0-10.

4.1.3 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

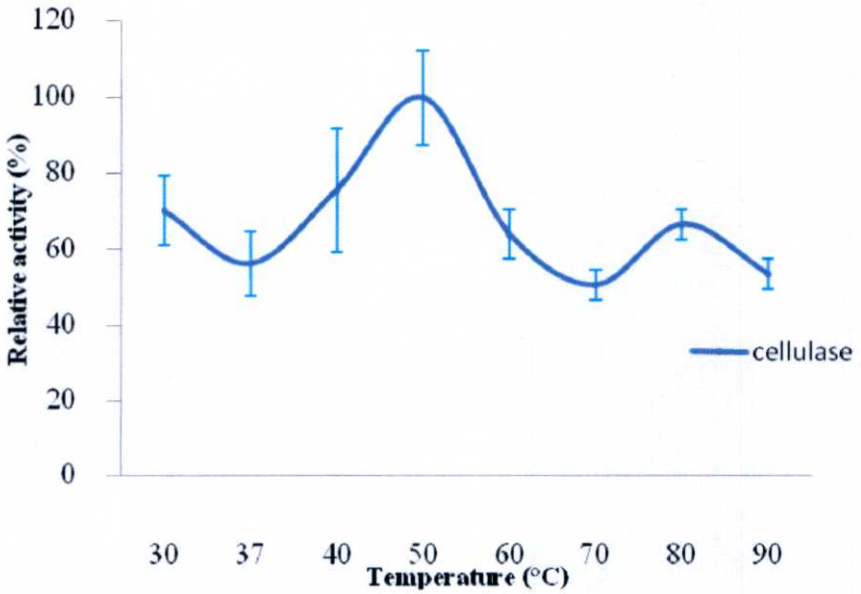
เมื่อบ่ม crude enzyme ในบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตท pH 7.0 บ่มเป็นเวลา 10 นาที พบว่าที่อุณหภูมิ 50°C เอนไซม์เซลลูเลสมีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดคือ 24.93±0.00 U.mg^{-1}(100%) ดังตารางที่ 4.3 (ภาพที่ 4.3) เอนไซม์มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม อุณหภูมิที่สูงหรือต่ำมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ อัตราการเกิดปฏิกิริยามีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิหนึ่ง เรียกว่าค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน (optimum temperature) เมื่ออุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าจุดนี้ อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะช้าลง เพราะเอนไซม์เกิดการเสียสภาพ (denaturation) หรืออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา โดยเอนไซม์เซลลูเลสจะเกิดการเสียสภาพที่อุณหภูมิประมาณ 80°C (เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์. 2551) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Seo *et al.*(2013) พบว่า ß -glucosidase ที่คัดแยกจากกระเพาะรูเมนของแพะพื้นเมืองเกาหลี Bacillus licheniformis JK7 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ คืออุณหภูมิ 50 °C สอดคล้องกับงานวิจัยของ Bhavsar *et al.*(2015) เอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราที่แยกได้จากบ่อหมัก มีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ที่ 50°C ได้ค่ากิจกรรมสูง

ตารางที่ 4.3 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่บ่มโดยใช้อุณหภูมิ 30-90 °C

Temperature (°C)	Specific activity[a,b] (U/mg protein)	Relative activity (%)
30	17.51±0.03	70
37	14.01±0.01	56
40	18.86±0.02	76
50	24.93±0.00	100
60	15.97±0.03	64
70	12.60±0.02	51
80	16.59±0.02	67
90	13.31±0.00	53

หมายเหตุ [a] ค่าเฉลี่ยการทดลอง 3 ครั้ง

[b] Specific activity U/mg protein = $\frac{\text{µMole ของน้ำตาล reducing sugar ที่คำนวณได้ x dilution factor}}{\text{ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml) x ปริมาตรเอนไซม์ที่ใส่ (ml) x เวลาที่บ่ม (min)}}$



ภาพที่ 4.3 ค่าฤทธิ์สัมพันธ์ของเอนไซม์เซลลูเลส (100% = 24.926±0.002 U.mg^{-1}) เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 – 90°C

4.1.4 ความจำเพาะของเอนไซม์ต่อการย่อยสารตั้งต้น (substrate specificity)

เมื่อนำเอนไซม์รวมที่สกัดจากแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P1 มาทดสอบการย่อยสับสเตรท ได้แก่ CMC, avicel pH101,xylan, และ filter paper (Whatman No. 1) ตามสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ พบว่าทำงานได้ดีเมื่อบ่มที่ pH 7 อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 10 นาที พบว่าเอนไซม์จากไอโซเลท ID2R1P1 สามารถย่อย CMC และ Avicel ได้ใกล้เคียงกัน โดยมีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 21.24±0.05 U.mg^{-1} และ 18.44±0.02 U.mg^{-1}ตามลำดับและสามารถย่อยกระดาษกรองได้ค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 8.70±0.05 U.mg^{-1}กล่าวได้ว่าเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P1 มีกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสทั้งแบบเอนโดกลูคาเนสและเอกโซกลูคาเนสนอกจากนี้เอนไซม์จากไอโซเลท ID2R1P1 ยังสามารถย่อย xylan ได้ โดยมีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 263.98±0.02 U.mg^{-1}(ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 ความสามารถของเอนไซม์จากแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P1 และ ID2R1P2 ในการย่อยสับสเตรทชนิดต่างๆ

สับสเตรท	ค่าแอคติวิตีจำเพาะ ($U.mg^{-1}$) ID2R1P1	ค่าแอคติวิตีจำเพาะ[1] ($U.mg-^{1}$) ID2R1P2
Xylan*	263.98 ± 0.02	1.36 ± 0.002
CMC**	21.24 ± 0.05	0.63 ± 0.04
Avicel pH101**	18.44 ± 0.02	<0.001
กระดาษกรอง Whatman No. 1**	8.70 ± 0.05	0.06 ± 0.003

*บ่มปฏิกิริยาที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 90°C นาน 5 นาที**บ่มปฏิกิริยาที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 50°C นาน 10 นาที

[1]มานิสา บุพตา (2555)

หมายเหตุ[a]ค่าเฉลี่ยการทดลอง 3 ครั้ง

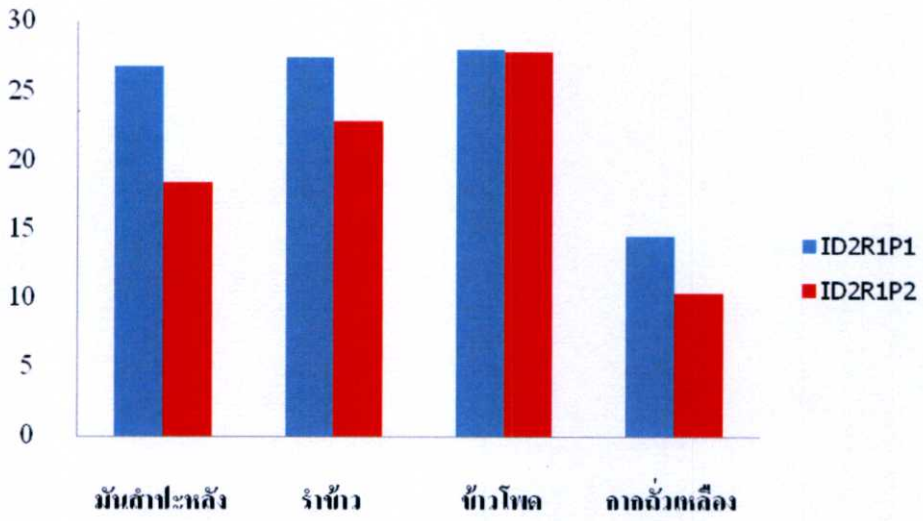
[b] Specific activity U/mg protein = $\frac{\text{µMole ของน้ำตาล reducing sugar ที่คำนวณได้ x dilution factor}}{\text{ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml) x ปริมาตรเอนไซม์ที่ใส่ (ml) x เวลาที่บ่ม (min)}}$

4.2 ผลของการย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์

ทำการศึกษาความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์ คือ มันสำปะหลัง รำข้าว ข้าวโพดและ กากถั่วเหลือง ในสภาวะที่เอนไซม์ทำงานดีที่สุดและบ่มเป็นเวลา 30 นาทีพบว่าเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P1 มีกิจกรรมเอนไซม์การย่อยข้าวโพดได้สูงสุด 28.09 มิลลิกรัมกลูโคสย่อยรำข้าว มันสำปะหลังได้รองลงมา 27.48 มิลลิกรัมกลูโคสและ 26.85 มิลลิกรัมกลูโคสตามลำดับ นอกจากนี้ยังย่อยกากถั่วเหลืองได้ 14.54 มิลลิกรัมกลูโคสเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P2 มีกิจกรรมเอนไซม์การย่อยข้าวโพดได้สูงสุด 27.84 มิลลิกรัมกลูโคสย่อยรำข้าว มันสำปะหลัง ได้รองลงมา 22.90 มิลลิกรัมกลูโคสและ 18.39 มิลลิกรัมกลูโคสตามลำดับ และย่อยกากถั่วเหลืองได้น้อย 10.35 มิลลิกรัมกลูโคสดังตารางที่ 4.5 (ภาพที่ 4.4)

ตารางที่4.5 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ย่อยจากวัสดุ 1 กรัม ของแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P1 และแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P2 (มิลลิกรัมกลูโคส)

Feedstuffs	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัม)	
	ID2R1P1	ID2R1P2
มันสำปะหลัง	26.85	18.39
รำข้าว	27.48	22.90
ข้าวโพด	28.09	27.84
กากถั่วเหลือง	14.54	10.35



ภาพที่ 4.4 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จากแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P1 และ ID2R1P2 ในการย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์

4.3 ประสิทธิภาพการย่อยอาหารสัตว์

นำอาหารไก่เนื้อเบทาโกร 204 มาทำการย่อย โดยบ่ม crude enzyme 20 ยูนิต กับอาหารสัตว์สำเร็จรูป 2% ที่สภาวะที่เหมาะสม เมื่อครบเวลาเติม 1 M HCL และ pepsin 3000 ยูนิต บ่มต่อที่อุณหภูมิ 40 °C เติม pancreatin ที่ละลายในโซเดียมไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 1M หยุดปฏิกิริยาบนน้ำแข็งนำตัวอย่างที่ได้ละลายในบัฟเฟอร์ pH 6 แล้วกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 แยกเก็บตะกอนไปวิเคราะห์น้ำหนักแห้งและเยื่อใยของพืชได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินดัดแปลงจาก Wu *et al.* (2004) และเก็บส่วนใสนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้ DNS reagent วิธี DNS method พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย ID2R1P2 สามารถย่อยได้ ซึ่งสังเกตจาก NDF ที่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้เสริมเอนไซม์ โดยปริมาณ NDFย่อยได้ 4.08% ADF ย่อยได้ 1.77% เฮมิเซลลูโลสย่อยได้ 2.48% และ ลิกนินย่อยได้ 0.53% และเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย ID2R1P1 สามารถย่อยได้โดยปริมาณ NDF ย่อยได้ 3.12% ADF ย่อยได้ 0.66% เฮมิเซลลูโลสย่อยได้ 2.46% และ ลิกนินไม่สามารถย่อยได้ (ตารางที่ 4.6) เอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้งสองสามารถย่อยอาหารสัตว์ได้เมื่อเทียบกับอาหารที่ไม่ได้เสริมเอนไซม์สอดคล้องกับการศึกษาของ Meng and Slominski (2005) ที่พบว่าการเสริมเอนไซม์ย่อยกลุ่มคาร์โบไฮเดรตรวม (multicarbohydrase) ที่ประกอบด้วยเซลลูเลส เพคติเนสแมนแนนเนส ไซแลนเนส กลูแคแนส อะไมเลส และโปรตีเอส ในอาหารไก่เนื้อช่วยปรับปรุงค่าการย่อยได้ในตัวสัตว์ (total tract digestibility) ของแป้ง (96.0 และ 97.2%) โปรตีน (79.6 และ 84.0%) และพลังงาน (3,114 และ 3,186 kcal/kg of diet) สาเหตุในการปลดปล่อยน้ำตาล เกิดจากการที่เอนไซม์เข้าไปทำหน้าที่ในการย่อยเยื่อใย ทำให้โครงสร้างของเยื่อใยเกิดการสลายตัวจึงปลดปล่อยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวออกมา คือ น้ำตาลกลูโคส (Malathi and Devegowda. 2001)

ตารางที่ 4.6 ประสิทธิภาพการย่อยอาหารไก่เนื้อเบทาโกร 204 อายุ 3-6 สัปดาห์

อาหารไก่สำเร็จรูป	%NDF	%ADF	% Hemicellulose	% lignin
อาหารไม่ใส่เอนไซม์	20.61	6.28	14.33	3.78
อาหารใส่เอนไซม์ ID2R1P1	17.48	5.62	11.87	4.12
อาหารใส่เอนไซม์ ID2R1P2	16.53	4.51	12.02	3.25
เยื่อใยที่ย่อยได้ของเอนไซม์ ID2R1P1	3.12	0.66	2.46	-0.34
เยื่อใยที่ย่อยได้ของเอนไซม์ ID2R1P2	4.08	1.77	2.48	0.53

หมายเหตุ a/ค่าเฉลี่ยการทดลอง 3 ครั้ง

จากผลการทดลองที่ได้ศึกษากิจกรรมเอนไซม์จากเชื้อ ID2R1P1 ได้ผลสรุปดังตารางที่ 4.7 โดยแสดงคู่กับกิจกรรมเอนไซม์จากเชื้อ ID2R1P2 กล่าวคือ การเลี้ยงเชื้อ ID2R1P1 เพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ควรเลี้ยงที่สภาวะการเลี้ยงในอาหาร CMC broth ที่ความเข้มข้น CMC1% และ yeast extract ที่ความเข้มข้น 0.1% บ่มที่อุณหภูมิ 39°C pH 7.0 เป็นเวลา 2 วัน และเมื่อพิจารณาสภาวะที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสทำงานได้ดีที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 50°C และบ่มเป็นเวลา 10 นาที และเอนไซม์จากเชื้อ ID2R1P1 สามารถย่อย CMC 1%, xylan 1% และ filter paper ได้และการเลี้ยงเชื้อ ID2R1P2 เพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสควรเลี้ยงที่สภาวะการเลี้ยงในอาหาร CMC broth ที่ความเข้มข้น CMC 3% และ yeast extract ที่ความเข้มข้น 0.1% บ่มที่อุณหภูมิ 39°C pH 5.0 เป็นเวลา 5 วัน เมื่อพิจารณาสภาวะที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสทำงานได้ดีที่ pH 6.0 อุณหภูมิ 50°C และบ่มเป็นเวลา 10 นาที

ตารางที่ 4.7 สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและคุณสมบัติการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อแบคทีเรียไอเลท ID2R1P1 และ ID2R1P2

	ID2R1P1	**ID2R1P2**
สภาวะการเลี้ยงเชื้อ		
temperature (°C)	39	39
pH	7	5.0
nitrogen source (0.1%)	yeast extract	yeast extract
time (days)	2	5
สมบัติการทำงานของเอนไซม์		
optimal time (min)	10	10
optimal pH	7.0	6.0
optimal temperature (°C)	50	50
pHstability [a)]	-	5.0-10.0
thermal stability [a)] (°C)	-	20-90
substrate	CMC, filter paper	CMC, filter paper

หมายเหตุ: [a)]มีกิจกรรมเอนไซม์ >50%

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยครั้งนี้ ใช้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนส 2 ไอโซเลท คือ ID2R1P1 และ ID2R1P2 ที่คัดแยกจากกระเพาะรูเมนกระบือพบว่า ไอโซเลท ทั้ง 2 มีความสามารถในการย่อยบนอาหารแข็ง CMC agar และ xylan agar มีค่า HC ของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสสูงที่สุด และได้ทำการศึกษาการเพิ่มปริมาณชิ้นยีน 16s rDNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าไอโซเลท ID2R1P2 พบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสมีความเหมือนกับเชื้อ *B. pumilus* (EU234500.1) ซึ่งมีความเหมือน 96 %ไอโซเลท ID2R1P1 พบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนส มีความเหมือนกับเชื้อ *Corynebacterium* sp. (X89778.1) ซึ่งมีความเหมือน 99% ไอโซเลท ID2R1P2 ได้มีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อและทดสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจะเลี้ยงในอาหาร CMC broth ที่ความเข้มข้น CMC 3% และ yeast extract 0.1% บ่มที่อุณหภูมิ 39°C pH 5.0 เป็นเวลา 5 วัน และผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจะเลี้ยงในอาหาร xylan broth ที่ความเข้มข้นไซแลน 1% และ yeast extract 0.1% บ่มที่อุณหภูมิ 39°C pH 5.0 เป็นเวลา 3 วัน การศึกษาครั้งนี้จึงได้นำไอโซเลท ID2R1P1 มาศึกษาคุณสมบัติการทำงานของเอนไซม์ จึงนำเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P1 มาเลี้ยงในอาหาร CMC broth ที่ความเข้มข้น CMC 1% และ yeast extract 0.1% เป็นระยะเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 39 °C pH 7.0 เขย่าด้วยความเร็วรอบ 230 rpm พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสสามารถทำงานได้ดีที่ 10 นาที pH 7.0 อุณหภูมิ 50°C จากการศึกษาความสามารถในการย่อยสับสเตรตพบว่าไอโซเลท ID2R1P1 มีคุณสมบัติแบบ multienzyme complex คือสามารถย่อยได้ทั้งสับสเตรตคาร์บอกซีเมททิลเซลลูโลส (CMC) และไซแลน (xylan) แต่สามารถย่อยกระดาษกรองได้น้อย จึงจัดอยู่ในกลุ่มเอนโดกลูคาเนส (endoglucanase)

เอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P1 และเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P2 ยังมีความสามารถในการย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์ได้โดยนำมาย่อยข้าวโพดบดหยาบ รำข้าว มันสำปะหลังและกากถั่วเหลืองโดยบ่มกับวัตถุดิบอาหารสัตว์เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าเอนไซม์จากแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดสามารถย่อยวัตถุดิบอาหารสัตว์เหล่านี้ได้ได้เป็นอย่างดีเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P1 มีการย่อยข้าวโพด 1 กรัม ให้ได้น้ำตาลกลูโคสสูงสุด 28.09 มิลลิกรัม เอนไซม์สามารถย่อยรำข้าว มันสำปะหลังได้เป็นน้ำตาลกลูโคส 27.48 และ 26.85 มิลลิกรัมกลูโคสตามลำดับ นอกจากนี้ยังย่อยกากถั่วเหลืองได้น้ำตาลกลูโคส 14.54 มิลลิกรัม เอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P2 สามารถย่อย

ข้าวโพด 1 กรัม ได้น้ำตาลกลูโคสสูงสุด 27.84 มิลลิกรัม สามารถย่อยรำข้าว มันสำปะหลัง และกากถั่วเหลืองได้น้ำตาลกลูโคส 22.90, 18.39 และ 10.35 มิลลิกรัม ตามลำดับ

การทดสอบโดยย่อยประสิทธิภาพการย่อยอาหารไก่เนื้อเบทาโกร 204 โดยบ่มกับcrude enzyme 20 ยูนิต กับอาหารสัตว์สำเร็จรูปที่สภาวะการจำลองกระเพาะสัตว์ปีก พบว่าเอนไซม์ที่ได้จากแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P1 และเอนไซม์ที่ได้จากแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P2 มีความสามารถในการช่วยย่อยวัตถุดิบในอาหารไก่ได้ดีกว่าอาหารที่ไม่ใส่เอนไซม์พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย ID2R1P2 สามารถย่อยได้ ซึ่งสังเกตจาก NDF ที่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้เสริมเอนไซม์ โดยปริมาณ NDF ย่อยได้ 4.08% ADF ย่อยได้ 1.77% เฮมิเซลลูโลส ย่อยได้ 2.48% และลิกนินย่อยได้ 0.53% และเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย ID2R1P1 สามารถย่อยได้โดยปริมาณ NDF ย่อยได้ 3.12% ADF ย่อยได้ 0.66% เฮมิเซลลูโลส ย่อยได้ 2.46% และ ลิกนินไม่สามารถย่อยได้ ดังนั้นการเสริมเอนไซม์ในอาหารสัตว์ สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยได้อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาต่อโดยนำไปทดลองกับไก่เพื่อดูประสิทธิภาพการย่อยได้ เพื่อประโยชน์ในการเพิ่มมูลค่าในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่เนื้อ

เอกสารอ้างอิง

กรมปศุสัตว์. 2556. การวิเคราะห์โดยวิธี Detergent method. [Online]. Available: http://www.dld.go.th/ncna_nak/index/Detergent%20analysis.html [cited 15/9/56.]

คณะกรรมการกลุ่มผลิตชุดวิชาหลักโภชนศาสตร์และอาหารสัตว์. 2543. **หลักโภชนศาสตร์และอาหารสัตว์**. พิมพ์ครั้งที่ 3, สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช, สุโขทัย. 516 น.

จันทรา กอนันทา. 2532. **กระบือ :สัตว์ที่ยังใช้ไม่คุ้มค่า**. พิมพ์ครั้งที่ 1 .พิมพ์ที่ โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว,กทม. 159น.

จรัญ จันทลักขณา. 2527.**ควายในระบบไร่นาไทย**. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช จำกัด, กทม. 131 น.

จรัส สว่างทัพ. 2548. **เอกสารคำสอน อาหารและการให้อาหารสัตว์**. คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์. 365 น.

ฉลอง วชิราภากร. 2541. **โภชนศาสตร์และการให้อาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องเบื้องต้น**. ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ชวนพิศ แดงสวัสดิ์. 2544. **สรีรวิทยาของพืช**. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์พัฒนาศึกษา, กทม. 380 น.

ทรงศักดิ์ จำปาวะดี. 2551. **โภชนศาสตร์โปรตีนในสัตว์เคี้ยวเอื้อง**. พิมพ์ที่ 1 หจก.โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา,ขอนแก่น. 210 น.

ทิภาภรณ์ งามสง่า. 2558. "สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ ID2R1P1 ที่จำแนกจากกระเพาะหมักของกระบือเพื่อผลิตเซลลูเลส." ปัญหาพิเศษ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร กรุงเทพฯ: สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เทอดชัย เวียรศิลป์. 2548. **โภชนศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง**. พิมพ์ครั้งที่ 5. เชียงใหม่: ภาควิชาสัตวศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ธงชาติ สุริยวงค์. 2556. "ผลของกากมันสำปะหลังเสริมด้วยเอนไซม์ไซลาเนสต่อการย่อยได้ของโภชนะสมรรถนะการเจริญเติบโต และคุณภาพซากของไก่เนื้อ." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. นครราชสีมา : มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

ธาตรี จีราพันธุ์. 2549. **อาหารและการให้อาหารสัตว์**.มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์ [Online]. Available: http://elearning.nsru.ac.th/web_elearning/animal/lesson1_8.php [cited 2/6/58.]

นิรุจน์ มณีสว่าง. 2554. "การย่อยได้ปรากฏและการเสริมในอาหารของเปลือกเมล็ดและคัพภะข้าวโพดต่อสมรรถภาพการผลิตแพะรุ่น." วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2541. **โภชนศาสตร์สัตว์**. พิมพ์ครั้งที่ 6.ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.170 น.

บุญเสริม ชีวอิสระกุล และบุญล้อม ชีวอิสระกุล. 2542. **พื้นฐานสัตวศาสตร์**. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

ปฐม เลาหะเกษตร. 2540. **การเลี้ยงสัตว์ปีก**. พิมพ์ครั้งที่ 3. โรงพิมพ์สหมิตรออฟเซต, นนทบุรี. 328 น.

เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์. 2551. **เอนไซม์ดัดแปรคาร์โบไฮเดรตในอุตสาหกรรม**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พันทิพา พงษ์เพียจันทร์. 2543. **หลักการอาหารสัตว์** เล่ม 1 โภชนะ (ฉบับปรับปรุง). พิมพ์ครั้งที่ 2,โอเดียนสโตร์, เชียงใหม่. 207 น.

พันทิพา พงษ์เพียจันทร์. 2547 .**หลักการอาหารสัตว์**.ครั้งที่ 2 ,โอเดียนสโตร์, เชียงใหม่. 600 น.

ภรณี ต่างวิวัฒน์, บุญล้อม ชีวะอิสระกุล และเสาวคนธ์ โรจนสถิตย์. 2553. **เอกสารการสอน หลักโภชนะศาสตร์และอาหารสัตว์**. ครั้งที่ 12 .สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมมาธิราช ,นนทบุรี. 516 น.

มานิสา บุพตา. 2555. "การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเซลลูเลสและไซแลนเนสจากกระเพาะหมักของกระบือ." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. กรุงเทพฯ: สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ระพีพรรณ อินปั๋นแก้ว. 2530. "แบคทีเรียในกระเพาะหมักของโคพื้นเมืองและ การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. เชียงใหม่ : มหาวิทยาเชียงใหม่.

ศรัณยา สถิตมั่นวิวัฒน์. 2551. "ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก (*Bubalusbubalis*)." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. กรุงเทพฯ: สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สาโรช ค้าเจริญ. 2542. **อาหารและการให้อาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง**. สำนักพิมพ์ หจก.โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา, ขอนแก่น.

เสาวนิต คูประเสริฐ. 2527 .**เอกสารสัตว์เบื้องต้น**. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่. ครั้งที่ 1. 134 หน้า.

เสกสม อาตมางกูร. 2545 ."เอนไซม์ในระบบย่อยอาหารและการเสริมเอนไซม์เพื่อช่วยในการย่อยอาหาร". **สุกรสาส์น.** 29(114): 11 – 18.

สุริยะ สะวานนท์. 2551 . **จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีชีวภาพด้านจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน**. พิมพ์ครั้งที่ 1 , โรงพิมพ์สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม กำแพงแสน, นครปฐม. 249 น.

สุวรรณ เกษตรสุวรรณ. 2535. **การเลี้ยงไก่.** พิมพ์ครั้งที่ 7. สำนักพิมพ์ บริษัท ประชาชน จำกัด, กรุงเทพมหานคร. 337 น.

ไสว นามคุณ. ม.ป.ป. **การเลี้ยงไก่ไข่.** [Online]. Available: http://www.did.go.th/service/layer/managel.html. [cited 16/6/55.]

อรวรรณ ชินราศรี . 2547. **เทคโนโลยีการผลิตสัตว์ปีก**. พิมพ์ครั้งที่ 1.สำนักพิมพ์ห้างหุ้นส่วนจำกัด อภิชาตการพิมพ์, มหาสารคาม. 206น.

อุทัย คันโธ. 2529 .**อาหารและการผลิตอาหารเลี้ยงสุกรและสัตว์ปีก**.ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์นครปฐม .พิมพ์ครั้งที่ 2. 297 น.

อาวุธ ตันโช. 2538. **การผลิตสัตว์ปีก**. กรุงเทพฯ : โอ.เอส.พริ้นติ้งเฮ้าส์.

Abudabos, A. 2010. "Enzyme Supplementation of Corn-Soybean Meal Diets Improves Performance in Broiler Chicken". **Internationnal Journal of Poultry Science**. 9(3) : 292 – 297.

Abudabos, A.M. 2012. "Phytate phosphorus utilization and intestinal in laying hens." **Italian Journal of Animal Science**. 11: 41–46.

Agbor, V.B., Clicek, N., Sparling, R., Berlin, A. and Levin, D.B. 2011."Biomass pretrement : Fundamentalw toward application." **Biotechnology Advances**. 29 : 675 – 685.

Akiba, S., Kimura, Y., Yamamoto, K., Kumagai, H. 1995."Purification and characterizationof a protease-resistant cellulase from Aspergillusniger". **Journal of Fermentation and Bioengineering**.79(2): 125- 130.

Ali, D., Soewarno, N., Sumarno, Primarini, D. and Sumaryono, W. (2011)."Cassava pulp as a biofuel feedstock of an enzymatic hydrolysis process." **Makara Journal of Technology**. 15(2): 183-192.

Alonso, D., Martins, B., Ferreira, H., Prado, A. D., Simes, R., Leite, R., Ferreira, H., Souza, M., Moretti, M., Silva, R. and Gomes, E. 2011."Agroindustrial Wastes as Substrates for Microbial Enzymes Production and Source of Sugar for Bioethanol Production." **Integrated Waste Management**. 2: 319 – 361.

Alves-Prado, H.F., Pavezzi, F.C., Leite, R.S.R., Oliveira, V.M., Sette, L.D. and DaSilva, R.2010."Screening and production study of microbial xylanase producers from Brazilian Cerrado." **Applied Biochemistry and Biotechnology**.161:333–346.

Bhavsar, N.H., Raoll, B.V., Amin, S.S. and Raol, G.G. 2015."Production, Optimization and Characterization of Fungal Cellulase for Enzymatic Saccharification of Lignocellosic Agro-waste." **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. 4(3): 30-46.

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

Church, D.C. and Pond,W.G. 1982. " **Basic Animal Nutrition and Feeding.2nd Ed**." New York : John Wiley and Sons, 403.

Cullison, A.E. 1979. **Feeds and Feeding**. Reston,Virginia : Reston Publishing Company Inc. A Prentice-Hall Company,595.

Dekker, R.F. and Richards, G.N. 1976. "Hemicelllase: their occurrence, purification, properties and mode of action." **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**.32: 277-352..

Dingle, JG. 1990. **Module 3: Metabolism: Nutrient Procurement and Processing**, Study Book: Poultry Husbandry 1, DEC, USQ, Toowoomba, Australia.

Duarte, M.C.T., Pellegrino, A.C.A., Portugal, E.P. Ponezi1, A.N. and Franco, T.T. 2000.Characterization of alkaline xylanases from Bacillus pumilus." **Brazilian Journal of Microbiology**.31:90-94.

Iyayi, E. A. and Davies , B. I. 2005. "Effect of Enzyme Supplementation of Palm Kernel Meal and Brewer's Dried Grain on the Performance of Broilers." **International Journal of Poultry Science.** 4 (2): 76-80.

Kamra, D. N. 2005. "Rumen microbial ecosystem." **Current Science**.89: 124–135.

Khempaka, S., Molee, W. and Guillaume, M. 2009.Dried cassava pulp as an alternative feedstuff for broilers effect on growth performance, carcass traits, digestive organs, and nutrient digestibility. **Journal of Applied Poultry Research.**18: 487–493.

Kononoff, P. J. and Janicek, B. 2007. **Feeding distillers grains to dairy cattle**. Department of Animal Science.University of Nebraska – Lincoln.

Kowsari, M. 2012. "Pictures for Lignocellulose Structure". [Online]. Available: http://biofuel.webgarden.com/sections/blog/pictures-for-lignocellulose. [cited 25/3/58]

Limcharoenporn, R., B. Cheva-isarakul and S. Tangtaweewipat.1997. "The Supplement of Phytase in Broiler Diet 2.Low Phosphorus Diets Containing Rapeseed Meal." **In Trends in Livestock Production in Thailand**. Proceedings of the Symposium at Chiang Mai University, 11th-13th December 1997.

Lu, M., Li, D., Gong, L., Ru, Y. and Ravindran, V. 2009."Effects of Supplemental Microbial Phytase and Xylanase on the Performance of Broilers Fed Diets Based on Corn and Wheat." **Japan Poultry Science Association**. 46: 217-223.

Malathi, V. and Devegowda, G. 2001. "In vitro evaluation of non-starch polysaccharide digestibility of feed ingredients by enzymes." **Poultry Science**.80 : 302 – 305.

Meng, X. and Slominski, B. A. 2005. "Nutritive values of corn soybean meal canola meal and peasfor broiler chickens as affected by a multicarbohydrase preparation of cell wall degrading enzymes." **Poultry Science**. 84: 1242-1251.

Miller, L.G. 1959. "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar." **Analytical Chemistry**.31: 246-248.

National Research Council. 1998. " **Nutrient requirements of swine. 10th ed.**"National Academy of Science, Washington, DC.

Nickel, R., Schummer, A. and Seiferle, E. 1973. **The Viscera of the Domestic Mammals**.Verlag Paul Parey, Berlin.

Owens, B., Tucker, L., Collins, M. A. and McCracken, K. J. 2008. "Effects of different feed additives alone or in combination on broiler performance, gut microflora and ileal histology." **British Poultry Science**. 49(2): 202-212.

Oyeleke, S.B. and Okusanmi, T.A. 2008."Isolation and characterization of cellulose hydrolyzing microorganism from the rumen of ruminants." **African Journal of Biotechnology**.7(10):1503-1504.

Rattanachomsri, U., Tanapongpipat, S., Eurwilaichirt, L. and Champreda, V. 2009."Simultaneous non-thermal saccharification of cassava pulp by multi-enzyme activity and ethanol fermentation by Candida tropicalis." **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 107(5): 488-493.

Russell, J.B. and Rychlik, J.L. 2001."Factors that alter rumen microbial ecology."**Science.** 292:1119-1122.

Saha, S., Roy, R., Sen S.K. and Ray, A.K. 2006."Characterization of cellulase-producing bacteria from the digestive tract of tilapia, Oreochromismossambica (Peters) and grass carp, Ctenopharyngodonidella (Valenciennes)." **Aquaculture Research**.37: 380-388.

Schedle, K., Pecina, J., Punz, C., Mair, C. and Windisch, W. 2012. "Inclusion of NSP-hydrolyzing enzymes in diets for grower-finisher pigs containing two levels of distillers dried grains with soluble." **Animal Review** . 18: 129-134.

Schroeder, J.W. 2004."Forage Nutrition for Ruminants". **Extension dairy specialist**.(AS-1250).

Seo, J.K., Park, T.S., Know, I.H., Piao, M.Y., Lee, C.H. and Ha, J.K. 2013. "Characterization of Cellulolytic and Xylanolytic Enzymes of Bacillus licheniformis JK7 Isolated from the Rumen of a Native Korean Goat." **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences.**26(1) : 50 -58.

Sewell, G.W., Aldrich, H.C., Williams, D., Mannarell, B., Wilkie, A., Hespell, R.E., Smith, P.H. and Ingram, L.O. 1988. "Isolation and characterization of xylan-degrading strains of Butyrivibriofibrisolvens from a napier grass-fed anaerobic digestert." **Applied and Environmental Microbiology**.54(5): 1085-1090.

Shankar, T. and Isaiarasu, L. 2011."Cellulase production by Bacillus pumilus EWBCM1 under varying cultural conditions." **Middle East Journal of Scientific Research**.8(1):40-45.

Sharmila, A.,Azhar, K.,Hezmee, M. N. and Samsudin, A. A. 2014. "Effect of xylanase and cellulase supplementation on growth performance, volatile fatty acids and caecal bacteria of broiler chickens fed with palm kernel meal-based diet." **Journal of Animal and Poultry Sciences**. 3(1) : 19-28.

Shirmohammad, F. and Mehri, M. 2011."Effects of dietary supplementation of multi-enzyme complex on the energy utilization in rooster and performance of broiler chicks." **African Journal of Biotechnology**. 10(38): 7541-7547.

Suksombat, W., Lounglawan, P. and Noosen, P. 2006. "Energy and protein evaluation of five feedstuffs used in diet in which cassava pulp as main energy source for lactating dairy cows". **uranaree Journal of Science and Technology**. 14: 99-107.

Tapingkae, W., Yachai, M., Visessanguan,W., Pongtanya, P. and Pongpiachan, P. 2008. "Influence of crude xylanase from Aspergillusniger FAS128 on the in vitro digestibility and production performance of piglets." **Animal Feed Science and Technology** .140: 125- 138.

Tufarelli, V., Dario, M. and Laudadio, V. 2007."Effect of xylanase Supplementation and Particle-Size on Performance of Guinea Fowl Broilers Fed Wheat-Based Diets." **International Journal of Poultry Science**.6(4): 302-307.

Van Soest, P.T., Roberson, J.B., and Lewis, B.A. 1991. "Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition." **Journal of Dairy Science**.74: 3583 – 3597.

Wanapat, M. 2001. "Swamp buffalo rumen ecology and its manipulation" [Online]. Available: http://www.mekarn.org/procbuf/wanapat.htm. [cited 04/2013.]

Wong, K.K.Y., Tan, L.U.L. and Saddler, J.N. 1988. "Multiplicity of ß-1, 4 xylanase in microorganisms functions and applications." **Microbiology Reviews** .52(3):305-317.

Wu, Y.B., Ravindran, V., Pierce, J. and Hendriks, W.H. 2004. "Influence of Three Phytase Preparations in Broiler Diets Based on Wheat or Corn : In vitro Measurements of Nutrient Release." **International Journal of Poultry Science**.3(7): 450-455.

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ การเตรียมสารละลาย

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Xylan agar (Srinon *et al.* 2006)

Xylan	1.00	g
รำข้าว	5.00	g
Yeast extract	1.00	g
Agar	16.00	g
น้ำกลั่น	1.0	L

นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว (121 °C) 15 นาที

2. Xylan broth

การเตรียมอาหารเหลว xylan broth มีส่วนประกอบเช่นเดียวกันกับอาหารแข็ง xylan agar แต่ไม่เติม agar นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว (121 °C) 15 นาที

3. CMC agar (Kasana *et al.* 2008)

$NaNO_3$	2.0	g
K_2HPO_4	1.0	g
$MgSO_4$	0.1	g
KCl	0.1	g
CMC	2.0	g
Peptone	0.2	g
Agar	17.0	g
น้ำกลั่น	1.0	L

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วค่อยเติม agar ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. CMC broth (อพัชชา วงศ์เจริญสถิตย์ และวราวุฒิ ครูส่ง. 2543)

CMC	0.5	%
Peptone	0.5	%
KH_2PO_4	0.5	%
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	%
Yeast extract	0.5	%
น้ำกลั่น	100	ml

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วค่อยเติม agar ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. Lubia-Bertani broth (LB broth)

Tryptone	10.0	g
Yeast extract	5.0	g
NaCl	10.0	g
น้ำกลั่น	1.0	L

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. Lubia-Bertani agar (LB agar)

Tryptone	10.0	g
Yeast extract	5.0	g
NaCl	10.0	g
Agar	15.0	g
น้ำกลั่น	1.0	L

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วค่อยเติม agar ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์

1. 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller. 1959)

3,5-dinitrosalicylic acid	10.6	g
NaOH	19.8	g
Potassium sodium tartate	306.0	g
$Na_2S_2O_5$	8.3	g
Phenol	7.6	ml
น้ำกลั่นอุ่น	1,416	ml

ละลาย Potassium sodium tartate ในน้ำกลั่นตามปริมาตรที่ต้องการ และจึงเติมสารละลายอื่นๆ ลง บรรจุใส่ขวดสีชาแล้วเก็บไว้ในที่มืด

2. การเตรียมสับสเตรท

1. 2% CMC

ผสม CMC 2 g อุ่นให้ CMC ละลายจนหมด ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 100 ml

2. 2% xylan

ผสม xylan 2 g อุ่นให้ xylan ละลายจนหมด ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 100 ml

3. การเตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 3-6

- 0.2M acetic acid
- 0.2M sodium acetate (tri-hydrate) (27.2 g / l)
- เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ตาม pH ที่ต้องการ

ตารางผนวกที่ ก1 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ sodium acetate

pH	vol. of 0.2M acetic acid	vol. of 0.2M sodium acetate
3	982.3 ml	17.7 ml
4	847.0 ml	153.0 ml
5	357.0 ml	643.0 ml
6	52.2 ml	947.8 ml

4. การเตรียมสารละลายโซเดียมอะซเตรตบัฟเฟอร์ pH 7-11

- 0.2M disodium hydrogen phosphate (28.4 g / l)
- 0.2M HCl
- 0.2M NaOH
- เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ตาม pH ที่ต้องการ

ตารางผนวกที่ ก2 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ sodium phosphate

pH	vol. of 0.2M disodium phosphate	vol. of 0.2M HCl	vol. of 0.2M NaOH
7	756.0 ml	244 ml	-
8	955.1 ml	44.9 ml	-
9	955.0 ml	45.0 ml	-
10	966.4 ml	-	33.6 ml

สีย้อมแกรม (ระพีพรรณ อินปั๋นแก้ว. 2530)

1. Gram iodine solution

Iodine	1.0	g
KI	2.0	g
น้ำกลั่น	300.0	ml

ละลาย iodine และ KI ในน้ำกลั่นให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชา

2. Safranine O solution

Safranine O	2.5	g
Absolute ethanol	100.0	ml
น้ำกลั่น	1	L

ละลาย safranine O ใน absolude ethanol ให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 L

3. Crystal violet

Crystal violet	0.5	g
น้ำกลั่น	100.0	ml

การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์ เยื่อใยในพืชอาหารสัตว์

1. สารละลาย Netural detergent

ก. น้ำกลั่น	1	L
ข. Sodium lauryl sulphate (USP)	30	gm
ค. Disodium ethylene diamine tetraacetate (EDTA) (dehydrate crystal, reagent grade)	18.61	gm
ง. Sodium borate decahydrate (reagent grade) ($Na_2B_4O_7 . 10H_2O$)	6.81	gm
จ. Disodium hydrogen phosphate (reagent grade) (Na_2HPO_4 anhydrous)	4.56	gm
ฉ. 2-ethoxy ethanol (ethylene glycolmonoethylether) (purified grade)	10	ml

วิธีเตรียม

ก. ชั่ง EDTA และ $Na_2B_4O_7 . 10H_2O$ แล้วใส่ในบีกเกอร์ (beaker) ขนาด 600 ml

ข. เติมน้ำกลั่น 200 ml คนให้ละลาย อาจใช้ความร้อนช่วยเพื่อให้ละลายเร็วขึ้น

ค. ชั่ง sodium lauryl sulphate ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 1000 ml และตวง 2-ethoxy ethanol จำนวน 10 ml ใส่ลงไป เติมน้ำกลั่นประมาณ 400 ml นำไปคนให้ละลายด้วยเครื่อง magnetic stirrer

ง. ชั่ง Na_2HPO_4 ใส่ในบีกเกอร์ละลายด้วยน้ำกลั่น 250 ml แล้วใช้ความร้อนช่วยให้ละลาย

จ. นำสารละลายที่เตรียมไว้ผสมให้เข้ากันในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 ลิตร

ฉ. ปรับปริมาตรให้เป็นๆ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

2. น้ำยา acid detergent หรือ น้ำยาวิเคราะห์ Acid detergent fiber (ADF)

ก. กรดกำมะถัน (reagent grade)	1	N
ข. Cetyl trimethy ammonium bromide (CTAB)		

วิธีเตรียม

ก. เตรียมกรดกำมะถัน (H_2SO_4) เข้มข้น 1N ไปเปตกรดกำมะถันเข้มข้น 96% (AR grade) มา 28 ml แล้วเติมลงในขวดวัดปริมาตร 1 ลิตร ที่ได้เติมน้ำกลั่นไว้บางส่วนแล้ว (อุณหภูมิ 20°C) ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ตรวจสอบ normality โดยการ titrate ด้วย standard NaOH 1 N หรือจะใช้ Na_2CO_3 1 N ผลที่ได้ควรจะเป็น 1N

ข. ชั่ง cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) มา 20 กรัม ตวงกรดกำมะถัน 1 N ที่เตรียมไว้มา 1 ลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง magnetic stirrer

3. การวิเคราะห์ lignin โดใช้กรดกำมะถัน

ก. การเตรียมกรดกำมะถัน (H_2SO_4) 72 % จำนวน 1000 ml

โดยเตรียมจากกรด H_2SO_4 เข้มข้น 96 % ความหนาแน่น 1.84 g/ml

กรัมของกรด H_2SO_4 96 % = 100*98.08*12 = 1226.0 g.

ดังนั้นปริมาณกรด H_2SO_4 96 % ที่จะนำมาในการเตรียม = 1226.0/1.84 = 666.30 ml.

วิธีเตรีม

เติมน้ำกลั่น 200 มล. ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มล. จากนั้นตวงกรด H_2SO_4 96 % จำนวน666.30 มล. ใสลงไปและเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มล. แล้วรอให้สารละลายในขวดวัดปริมาตรเย็น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มล. อีกครั้ง (ระหว่างรอให้เย็นปริมาตรจะลดลง) แล้วผสมให้เข้ากัน

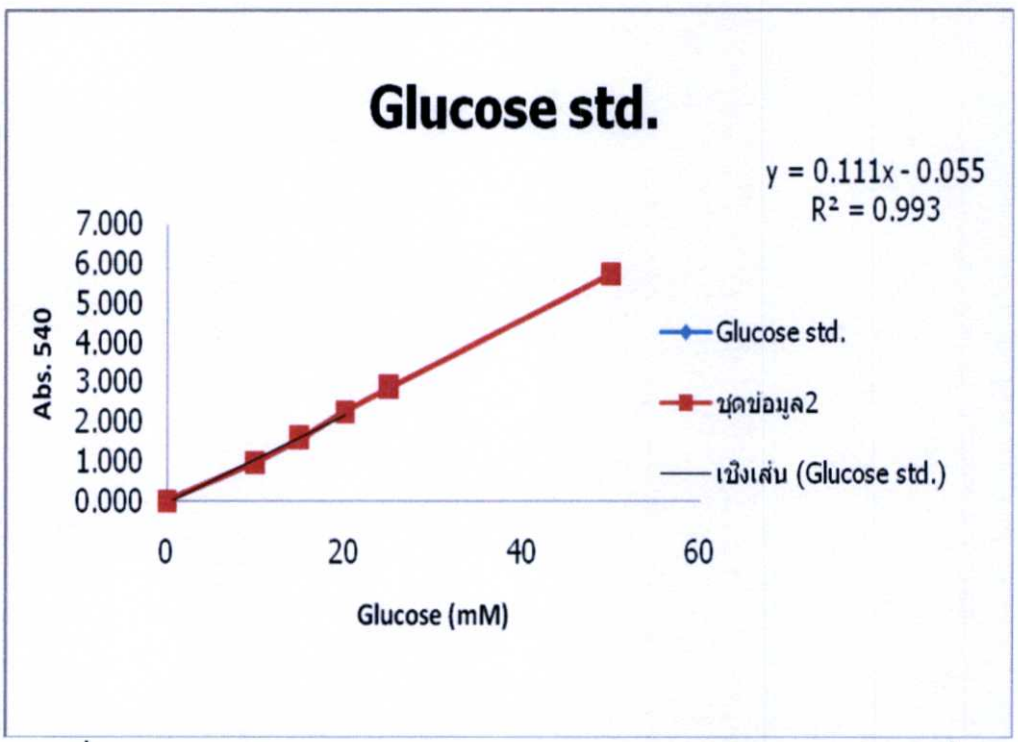
ภาคผนวก ข.

การวิเคราะห์เอนไซม์

1. การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS ตามวิธี Miller (1959)

การเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

1. ชั่งน้ำตาลกลูโคส 0.1 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml โดยใช้ขวดปรับปริมาตร
2. เจือจางให้ได้สารละลายน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้น 0.1-0.5 mg/ml
3. ปิเปตสารละลายน้ำตาลกลูโคสจากข้อ 2 มาความเข้มข้นละ 100 µl ลงในหลอดทดลอง (ใช้น้ำกลั่น 1 ml เป็น blank)
4. เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 600 µl นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที
5. รอจนเย็นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm
6. นำข้อมูลไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลกลูโคส



ภาพผนวกที่ ข1 แสดงกราฟมาตรฐานกลูโคส (Glucose Standard) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm

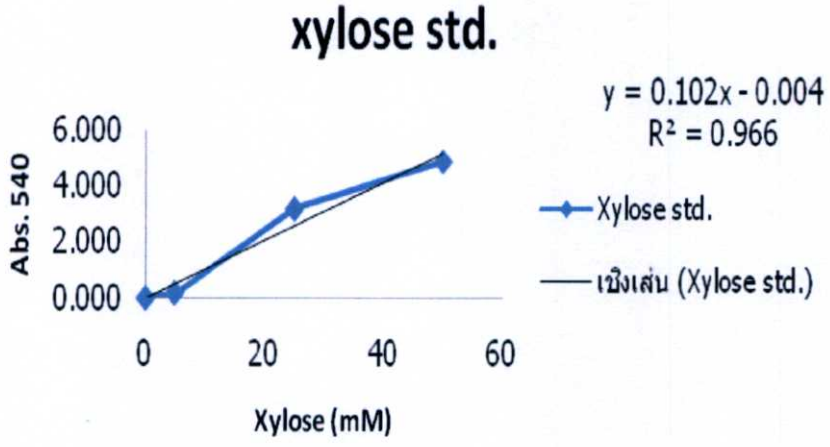
ตารางผนวกที่ ข1 แสดงค่ามาตรฐานกลูโคสที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์

Glucose (mM)	OD 540
0	0.000
10	0.968
15	1.579
20	2.248
25	2.863
50	5.750

2. การวิเคราะห์น้ำตาลไซโลสด้วยวิธี DNS ตามวิธี Miller (1959)

การเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซโลส

1. ชั่งน้ำตาลไซโลส 0.1 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml โดยใช้ขวดปรับปริมาตร
2. เจือจางให้ได้สารละลายน้ำตาลไซโลสที่มีความเข้มข้น 0.1-0.5 mg/ml
3. ปิเปตสารละลายน้ำตาลไซโลสจากข้อ 2 มาความเข้มข้นละ 100 µl ลงในหลอดทดลอง (ใช้น้ำกลั่น 1 ml เป็น blank)
4. เติมสารละลาย DNS 600 ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที
5. รอจนเย็นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm
6. นำข้อมูลไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลไซโลส



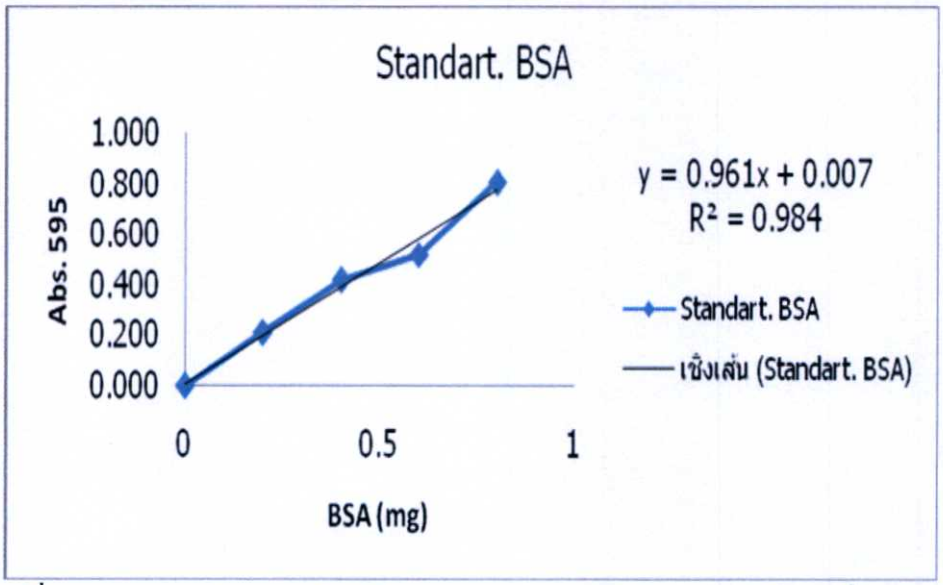
ภาพผนวกที่ ข2 แสดงกราฟมาตรฐานไซโลส (xylose standard) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm

ตารางผนวกที่ ข2 แสดงค่ามาตรฐานไซโลสที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์

xylose (mM)	OD 540
0	0.000
5	0.163
25	3.182
50	4.866

3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธี Bradford (1976)

ทำกราฟมาตรฐาน (standard curve) ของสารละลายโปรตีนโดยนำ bovine serum albumin : BSA (Serva, US) มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 mg/ml จากนั้นนำสารละลาย BSA ที่เข้มข้นแตกต่างกันมาอย่างละ 20 µl ผสมกับน้ำยาวัดโปรตีน (Bio-rad, US) 1 ml แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวแสง 595 nm นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน คำนวณสมการถดถอย y = ax+b โดยค่า y เป็นค่าการดูดกลืนแสงและค่า x เป็นค่าความเข้มข้นของสารละลาย BSA



ภาพผนวกที่ ข3 แสดงกราฟมาตฐานโปรตีน (BSA standard) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm

ตารางผนวกที่ ข3 แสดงค่ามาตรฐาน BSA ของการวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีน

BSA (mg/ml)	Abs 595 nm
0	0.000±0.000
0.2	0.211±0.022
0.4	0.420±0.058
0.6	0.520±0.045
0.8	0.807±0.100

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวทิภาภรณ์ งามสง่า
วัน/เดือน/ ปีเกิด	1 พฤศจิกายน 2530
ที่อยู่	12/6 ม. 9 ต. บางหัวเสือ อ.พระประแดง จ. สมุทรปราการ 10130
ประวัติการศึกษา	2552 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตรสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง
ผลงานทางวิชาการ	ผลงานตีพิมพ์ ทิภาภรณ์ งามสง่า, จุฑาทิพย์ เฉลิมวานิชวงศ์, กนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์, กานต์ สุขสุแพทย์และ กัญญา จิระเจริญรัตน์ “การประเมินกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสที่ผลิตโดยแบคทีเรียจากกระเพาะหมักของกระบือ”.การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 29 ระหว่างวันที่ 24-25 ตุลาคม 2556.มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
ทุนวิจัยที่ได้รับ	สนับสนุนงานวิจัยจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรสำนักงานบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษากระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE)