

การคัดเลือกจุลินทรีย์ในการผลิตเซลลูเลสและไซลันเนส

SCREENING OF MICROORGANISMS FOR CELLULASE
AND XYLANASE PRODUCTION

พริษฐ์พร ศรีมังกด
PIROONPORN SRIMONGKOL

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2552

KMITL-2000-SC-M-000-000

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

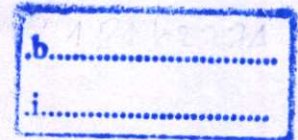
การคัดเลือกจุลินทรีย์ในการผลิตเซลลูเลสและไซลานเนส

SCREENING OF MICROORGANISMS FOR CELLULASE
AND XYLANASE PRODUCTION



พิรุพห้พร ศรีมงคล
PIROONPORN SRIMONGKOL

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....105308
วัน,เดือน,ปี.....18 พ.ย. 2552



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2552

KMITL-2009-SC-M-020-009

**SCREENING OF MICROORGANISMS FOR CELLULASE
AND XYLANASE PRODUCTION**

PIROONPORN SRIMONGKOL

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE
DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
FAULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2009

KMITL-2009-SC-M-020-009

COPYRIGHT 2009

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกจุลินทรีย์ในการผลิตเซลลูเลสและไซลานเนส
Screening of Microorganisms for Cellulase and Xylanase Production
นักศึกษา นางสาวพิรุฬห์พร ศรีมงคล
รหัสประจำตัว 48068303
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.มาริสา จาคูพรพิพัฒน์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.อารี ฤทธิบุญรณ์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
รศ.สุขใจ	ชูจันทร์	
ผศ.ดร.มาริสา	จาคูพรพิพัฒน์	
รศ.อารี	ฤทธิบุญรณ์	
รศ.ดร.เกษม	สร้อยทอง	
รศ.ดร.พิชัย	สราญรัมย์	

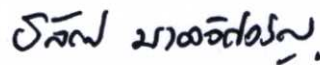
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

วัน / เดือน / ปี ที่สอบ 27 มีนาคม พ.ศ. 2552 เวลา 13.00 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ อาคารจุฬารณวลัยลักษณ์ 1 ห้อง 424

คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว



(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีรวัฒน์ มงคลอัครวัฒน์)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

วันที่ 26 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2552

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกจุลินทรีย์ในการผลิตเซลลูเลสและไซทานเนส
นักศึกษา	พิรุฬห์พร ศรีมงคล
รหัสนักศึกษา	48068303
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2552
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.มารีสา จาคูพรพิพัฒน์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รศ.อารี ฤทธิบุรณ์

บทคัดย่อ

การคัดแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินบริเวณต่าง ๆ ในจังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 20 ตัวอย่าง พบจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในอาหารทดสอบที่มีแอลฟาเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน รวมทั้งสิ้น 198 ไอโซเลท จากการศึกษาลักษณะโคโลนีและลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สามารถจำแนกเบื้องต้นได้เป็น เชื้อรา แบคทีเรียและแอกติโนมัยซิส ซึ่งเชื้อแบคทีเรียถูกพบมากที่สุด รองลงมาคือแอกติโนมัยซิสและเชื้อรา จำนวน 150, 34 และ 14 ไอโซเลท ตามลำดับ จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพการสร้างเอนไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี congo red test บนอาหารที่มีคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสเป็นสับสเตรท คัดเลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการย่อยโดยพิจารณาจากค่าอัตราส่วนวงใสต่อขนาดโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ พบว่ามีไอโซเลทที่ถูกคัดเลือกมาทดสอบขั้นต่อไปทั้งหมด 41 ไอโซเลท ได้แก่เชื้อรา แบคทีเรียและแอกติโนมัยซิส จำนวน 8, 27 และ 6 ไอโซเลท ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในสถานะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลวที่มีแอลฟาเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเชื้อราไอโซเลท FA68 และ FA50 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 0.17 และ 0.13 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ สำหรับแบคทีเรียและแอกติโนมัยซิส ไอโซเลท BA118 และ AA15 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 0.06 และ 0.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ นำจุลินทรีย์ทั้ง 4 ไอโซเลทมาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร 5 ตัวอย่าง ได้แก่ กากกาแฟ ชงข้าวโพด เศษใบไม้ กากปาล์มและฟางข้าว ผลการทดลองพบว่าจุลินทรีย์สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซทานเนสได้ดี โดยเฉพาะไอโซเลท FA68

การผลิตหัวเชื้อราโดยใช้เมล็ดข้าวฟ่างพบว่าสถานะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราทั้ง 2 ไอโซเลท คืออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80 โดยไอโซเลท FA50 สามารถผลิตสปอร์ได้ปริมาณสปอร์สูงที่สุดเท่ากับ 9.46 log สปอร์ต่อกรัม ในวันที่ 5 ของการเลี้ยง

เชื้อ ในขณะที่ไอโซเลท FA68 มีปริมาณสปอร์สูงที่สุดเท่ากับ 10.27 log สปอร์ต่อกรัมเมล็ดข้าวฟ่าง ในวันที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ

สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแอกติโนมัยซิส AA15 สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 100 มีปริมาณเซลล์สูงที่สุด เท่ากับ 7.41 log CFU ต่อกรัมเมล็ดข้าวฟ่าง ในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ

การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย BA118 โดยวิธีการพื้นผิวผลตอบสนอง (Response Surface Methodology : RSM) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 6.6 อัตราเร็วในการเขย่า 195 รอบต่อนาที ให้ผลผลิตเซลล์สูงสุดที่ 16 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

การจัดจำแนกเชื้อราในระดับสกุลโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ พบว่าไอโซเลท FA50 และ FA68 คือเชื้อราในสกุล *Aspergillus* sp. แบคทีเรีย BA118 อยู่ในสกุล *Bacillus* sp. และแอกติโนมัยซิส AA15 อยู่ในสกุล *Streptomyces* sp.

Thesis Title	Screening of Microorganisms for Cellulase and Xylanase Production
Student	Miss Piroonporn Srimongkol
Student ID.	48068303
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	2009
Thesis Advisor	Assist. Prof. Dr. Marisa Jatupornpipat
Thesis Co-Advisor	Assoc. Prof. Aree Rittiboon

ABSTRACT

One hundred and ninety-eight microbial isolates (150 bacteria, 14 fungi and 34 actinomycetes) were isolated from soil at different areas of Kanchanaburi Province, Thailand. The selective media used in the isolations contained 1% α -cellulose as the only carbon source for primary screening. The isolation cultures were incubated at 45°C for 5 days. A clear zone appeared as the result of cellulose degradation when each selected isolate was tested with 0.1% congo red and 1M NaCl on carboxymethyl cellulose (CMC) agar. For secondary screening, the microorganisms were inoculated into cellulose broth at 45°C for 7 days. The isolates FA68, FA50, AA15 and BA118 gave high degrees of cellulose degradation of the enzyme CMCase when 5 agricultural wastes (coffee pulp, corn cob, dry leaves, palm fiber and rice straw) in solid-state fermentation were tested. There were four isolates especially the isolate FA68 grew well at 45°C and produced high levels of cellulase and xylanase activities.

The production of microbial compost starters and optimum conditions of fungi and actinomycetes in sorghum seeds were investigated. The results were that the isolates FA50 and FA68 grew well at 37°C and 80% initial moisture with the sporulation rates of 9.46 and 10.27 log spore/g in sorghum for 5 days and 6 days, respectively. The optimum growth conditions of the isolate AA15 were 37°C and 100% initial moisture while the sporulation was 7.41 CFU/g in 7 days. The optimum growth conditions of the isolate BA118 were 37 °C, initial pH 6.6 and the shaking rate 195 rpm when the culture was incubated for approximately 16 hours.

The fungi were identified by morphological, physiological and cultural studies on colonies and spore production and the results were that the isolates FA50 and FA68 were

identified to be the genus *Aspergillus* while those of the varieties BA 118 and AA15 were *Bacillus* and *Streptomyces*, respectively.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงเนื่องด้วยความกรุณาตลอดทั้งคำแนะนำและความช่วยเหลือจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มารีสา จาคูพรพิพัฒน์ ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา และ รองศาสตราจารย์ อารี ฤทธิบูรณ์ ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งและขอขอบพระคุณในความอนุเคราะห์ของอาจารย์เป็นอย่างสูง

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ สุขใจ ชูจันทร์ ประธานกรรมการสอบ วิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. เกษม สร้อยทอง ผู้ทรงคุณวุฒิภายในสถาบันฯ และ รองศาสตราจารย์ ดร. พิชัย สราญรัมย์ ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกสถาบันฯ ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่า รวมถึงคำแนะนำ ตรวจสอบและแก้ไขเพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความเรียบร้อยสมบูรณ์

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พรณี ฐิตาภิจิต ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าในการตรวจรูปเล่มและให้คำปรึกษาแนะนำ ตลอดจนให้ความรู้และความเมตตาแก่ข้าพเจ้าเสมอมา

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่ ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัยและทุนสนับสนุนการเสนอบทความ

ขอขอบพระคุณพี่ ๆ เจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในทุก ๆ เรื่อง

ขอขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่ให้ความรู้ คำแนะนำ คำสั่งสอนด้วยความเมตตาเสมอมา

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ธุรการและนักวิทยาศาสตร์ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในทุก ๆ เรื่อง

ขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ และ น้อง ๆ นักศึกษาทั้งปริญญาตรีและปริญญาโททุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ เรื่อง ขอขอบคุณสำหรับมิตรภาพที่ดีตลอดมาข้าพเจ้าจะเก็บไว้ในความทรงจำตลอดไป

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อวิชา ศรีมงคล และคุณแม่แทตจิกา ศรีมงคล ที่คอยสนับสนุนให้กำลังใจ ขอขอบคุณสำหรับความรักของพ่อกับแม่ที่ทำให้ข้าพเจ้าได้มีวันนี้

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอบอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

พิรุฬห์พร ศรีมงคล

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	X
สารบัญรูป.....	XII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	1
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 บทบาทและความสำคัญของจุลินทรีย์ในดิน.....	4
2.2 จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายสารอินทรีย์คาร์บอน.....	4
2.3 องค์ประกอบของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส.....	5
2.3.1 เซลลูโลส (Cellulose).....	7
2.3.2 เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose).....	8
2.3.3 ลิกนิน (Lignin).....	10
2.4 เอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลส.....	11
2.4.1 เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase).....	11
2.4.2 เอนไซม์ไซลันเนส (xylanase).....	12
2.5 จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลส.....	13
2.5.1 เชื้อรา.....	13
2.5.2 แบคทีเรีย.....	14
2.5.3 แอคติโนมัยซิส.....	14
2.6 การคัดแยกและการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส.....	14
2.6.1 การคัดแยก.....	14
2.6.2 การคัดเลือก.....	18

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.7 การผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์เร่งปุ๋ยหมัก.....	18
2.8 การออกแบบพื้นที่การตอบสนอง (Response Surface Methodology , RSM).....	19
2.8.1 พิจารณาค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Standard Error: SE).....	19
2.8.2 การพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of Determination : R^2).....	20
2.9 การวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD).....	21
2.10 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	24
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	28
3.1 วัสดุ.....	28
3.1.1 วัตถุดิบ.....	28
3.1.2 จุลินทรีย์.....	28
3.2 สารเคมีและวัสดุที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	28
3.3 อุปกรณ์.....	29
3.4 วิธีการ.....	29
3.4.1 การเก็บตัวอย่าง.....	29
3.4.2 ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของดิน.....	30
3.4.3 การแยกเชื้อจุลินทรีย์ย่อยเซลลูโลสจากดิน.....	31
3.4.4 คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยเซลลูโลส ในสภาพอาหารแข็ง.....	32
3.4.5 คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยเซลลูโลส ในสภาพอาหารเหลว.....	33
3.4.6 ศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร.....	34
3.4.7 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์.....	35
3.4.7.1 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส.....	35
3.4.7.2 กิจกรรมของเอนไซม์ไคทาเนส.....	35

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4.8 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตหัวเชื้อ.....	35
3.4.8.1 แบททีเรีย.....	35
3.4.8.2 เชื้อรา.....	38
3.4.8.3 แอคติโนมัยซิส.....	38
3.4.9 การจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ในระดับจีโนม.....	39
3.4.9.1 แบททีเรีย.....	39
3.4.9.2 เชื้อรา.....	39
3.4.9.3 แอคติโนมัยซิส.....	39
3.4.10 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ.....	40
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	41
4.1 ผลการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของดิน.....	41
4.2 ผลการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ย่อยเซลลูโลสได้จากดิน.....	41
4.2.1 การคัดแยกขั้นที่ 1 (Primary screening).....	41
4.2.2 การคัดแยกขั้นที่ 2 (Secondary screening).....	42
4.3 ผลการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยเซลลูโลสในอาหารเหลว.....	48
4.4 ผลการศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร.....	50
4.5 ผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ถูกคัดเลือก.....	52
4.5.1 แบททีเรีย.....	52
4.5.2 เชื้อรา.....	60
4.5.3 แอคติโนมัยซิส.....	61
4.6 ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ถูกคัดเลือก.....	63
4.6.1 แบททีเรีย.....	63
4.6.2 เชื้อรา.....	63
4.6.3 แอคติโนมัยซิส.....	63

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.7 ผลการจัดจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ในระดับจีโนม.....	65
4.7.1 แบคทีเรีย.....	65
4.7.2 เชื้อรา.....	68
4.7.3 แอคติโนมัยซิส.....	69
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	70
บรรณานุกรม.....	73
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม.....	87
ภาคผนวก ข วิธีการเตรียมสารเคมี.....	91
ภาคผนวก ค วิธีทดสอบและวิเคราะห์.....	94
ภาคผนวก ง ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ.....	102

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสได้.....	5
2.2 ชนิดและปริมาณวัสดุเหลือทิ้งชนิดต่าง ๆ ในประเทศไทย.....	6
2.3 ส่วนประกอบในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรบางชนิด	14
2.4 ชนิดของสับสเตรตที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการศึกษา ความสามารถในการย่อยโดยเอนไซม์เซลลูเลสและวิธีกาวิเคราะห์.....	17
3.1 ตัวแปรอิสระและระดับของตัวแปรอิสระทั้ง 5 ระดับ ตาม แผนการทดลองแบบ CCD.....	36
3.2 สภาวะที่ใช้ในการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการ เจริญของแบคทีเรีย BA118 จากแผนการทดลองแบบ CCD.....	37
4.1 แสดงข้อมูลตัวอย่างดินที่เก็บจากจังหวัดกาญจนบุรี.....	43
4.2 จำนวนจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณต่าง ๆ ในจังหวัดกาญจนบุรีบนอาหารแข็งแอลฟาเซลลูโลส บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส.....	44
4.3 อัตราส่วนวงใสต่อโคโลนีของเชื้อราเมื่อเลี้ยงบนอาหาร CMC agar ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน.....	45
4.4 ตารางสถิติแสดงค่าตำแหน่งเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 60 ของค่า อัตราส่วนวงใสต่อโคโลนีของเชื้อราเมื่อทดสอบด้วยวิธี congo red test บนอาหารแข็ง CMC ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน.....	46
4.5 อัตราส่วนวงใสต่อโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงบน อาหาร CMC agar ที่อุณหภูมิ 45 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	47
4.6 ตารางสถิติแสดงค่าตำแหน่งเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 60 ของค่าอัตราส่วน วงใสต่อโคโลนี ของเชื้อแบคทีเรียเมื่อทดสอบด้วยวิธี congo red test บนอาหารแข็ง CMC ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน.....	48
4.7 อัตราส่วนวงใสต่อโคโลนีของเชื้อแอคคิโนมายซิสมือเลี้ยง บนอาหาร CMC agar ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน.....	49

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.8 ค่าความขุ่นของเซลล์แบคทีเรีย BA 118 เมื่อเลี้ยงในอาหาร NB เป็นเวลา 24 ชั่วโมงความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในสภาวะที่ได้จากแผนการทดลองแบบ CCD.....	53
4.9 แสดงค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของแต่ละตัวแปร (X_i) โดยโปรแกรม SPSS.....	54
4.10 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของแบบจำลองเพื่อคำนวณหาค่า F.....	57
4.11 จำนวนสปอร์เจลีย์ของเชื้อรา FA50 ที่อุณหภูมิและปริมาณความชื้นเริ่มต้นระดับต่าง ๆ.....	61
4.12 จำนวนสปอร์เจลีย์ของเชื้อรา FA68 ที่อุณหภูมิและปริมาณความชื้นเริ่มต้นระดับต่าง ๆ.....	62
4.13 จำนวนโคโลนีเจลีย์ของแอคติโนมัยซิส AA15 ที่อุณหภูมิและปริมาณความชื้นเริ่มต้นระดับต่าง.....	62
4.14 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. BA118.....	67

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของเซลลูโลส.....	7
2.2 เซลลูโลสจากธรรมชาติ (native cellulose).....	8
2.3 โครงสร้างของไซแลน.....	9
2.4 โครงสร้างของลิกนิน.....	10
2.5 กลไกการย่อยสลายเซลลูโลสโดยการทำงานของระบบเอนไซม์เซลลูเลส.....	11
2.6 กลไกการย่อยสลายไซแลนโดยการทำงานของระบบเอนไซม์ไซแลนเนส.....	12
2.7 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก <i>Phlebia gigantea</i> บนอาหารแข็ง CMC และทดสอบด้วยวิธี congo red.....	16
2.8 แสดงพื้นผิวผลตอบสนองในรูปแบบของกราฟแบบโครงร่างพื้นผิว.....	20
2.9 จุดของการออกแบบ 15 สิ่งทดลองในแบบ composite design ที่มี 3 ปัจจัย.....	21
3.1 ตำแหน่งการหยดสารละลายเซลล์แบคทีเรียด้วยวิธี agar spot บนอาหารแข็ง CMC.....	32
4.1 จุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารแข็งแอลฟาเซลลูโลส เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน.....	42
4.2 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรีย ราและแอคติโนมัยซิส ทั้ง 4 ไอโซเลทที่คัดเลือก เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	49
4.3 วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร.....	50
4.4 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสที่เกิดจากการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรของเชื้อแบคทีเรีย ราและแอคติโนมัยซิสทั้ง 4 ไอโซเลท ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส.....	51
4.5 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซแลเนสที่เกิดจากการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรของเชื้อแบคทีเรีย ราและแอคติโนมัยซิสทั้ง 4 ไอโซเลท ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส.....	52
4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของพีเอชเริ่มต้นและอัตราการเขย่าที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์.....	58
4.7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของพีเอชเริ่มต้นและอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์.....	59

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของอุณหภูมิเริ่มต้นและอัตราการ เขย่าที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์.....	59
4.9 กราฟการเจริญของไอโซเลทที่ถูกคัดเลือก.....	64
4.10 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. BA118 บนอาหาร NA.....	66
4.11 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. ภายใต้กล้องกำลังขยาย 1,000เท่า.....	66
4.12 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Aspergillus</i> sp. FA50.....	68
4.13 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Aspergillus</i> sp. FA68.....	69
4.14 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแอสคิโนมัยซิส AA15.....	69

ปุ๋ยหมักเป็นปุ๋ยอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพสูงในการปรับปรุงคุณสมบัติต่าง ๆ ของดินให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืชและเป็นแหล่งอินทรีย์วัตถุที่สำคัญในดิน แต่อย่างไรก็ตามปุ๋ยอินทรีย์ยังมีข้อจำกัดในการใช้คือ มีธาตุอาหารต่ำทำให้ต้องใส่ในปริมาณที่สูงและที่สำคัญระยะเวลาในการทำปุ๋ยหมักค่อนข้างนาน งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาและคัดเลือกจุลินทรีย์จากดินที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดี โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อที่จะลดระยะเวลาในการผลิตปุ๋ยหมักให้สั้นลงเพื่อให้เกษตรกรสามารถนำปุ๋ยหมักไปใช้ได้ทันในช่วงฤดูการเพาะปลูกโดยจะคัดเลือก สายพันธุ์ที่สามารถเจริญเติบโตและสร้างเอนไซม์เซลลูเลสและไซลานเนสที่อุณหภูมิสูงได้ ซึ่งจะส่งผลดีต่อการนำไปใช้ประโยชน์ในกระบวนการหมักปุ๋ย เนื่องจากความร้อนที่เกิดจากกระบวนการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุจะมีอุณหภูมิที่สูงมากส่งผลให้จุลินทรีย์หยุดการเจริญหรืออาจตายได้หรือมีผลทำให้เอนไซม์เสียสภาพ สำหรับสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้วสามารถนำไปผลิตเป็นหัวเชื้อเร่งปุ๋ยหมักให้อยู่ในรูปแบบที่ง่ายต่อการนำไปใช้เพื่อให้เกษตรกรสามารถนำไปทำปุ๋ยหมักชีวภาพได้เองเนื่องจากมีวิธีการทำที่ไม่ซับซ้อนเหมาะสมกับสภาพสังคมไทยที่เป็นสังคมเกษตรกรรม

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 รวบรวมและคัดเลือกจุลินทรีย์จากดินที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่ อุณหภูมิสูง

1.2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลานเนสของเชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกคัดเลือก

1.2.3 จัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบทางชีวเคมี

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

เก็บตัวอย่างและคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสจากตัวอย่างดินตามแหล่งต่าง ๆ ในจังหวัดกาญจนบุรี จากนั้นทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยเซลลูโลสและทนอุณหภูมิสูงได้ในขั้นต้นโดยวิธี spread plate บนอาหารแข็งที่มีแอลฟาเซลลูโลส (α -cellulose) เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ทดสอบความสามารถในการย่อยเซลลูโลสโดยวิธี congo red test คัดแยกไอโซเลท (isolate) ที่ให้ค่าอัตราส่วนวงใสต่อขนาดโคโลนีตั้งแต่ตำแหน่งเปอร์เซ็นต์ที่ 60 ขึ้นไปมาทดสอบความสามารถในการย่อยเซลลูโลสในอาหารเหลว ทำการคัดเลือกไอโซเลทที่ให้ผล กิจกรรมเอนไซม์สูง โดยวัดในรูปของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีการใช้กรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid) ของ Miller (1959) จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพการย่อยในสภาพอาหารแข็งโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นแหล่ง

คาร์บอนโดยทำการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทดสอบคุณสมบัติทางเคมีบางประการของจุลินทรีย์ที่ได้เพื่อจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ในระดับจีโนม และหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเพื่อเพิ่มปริมาณหัวเชื้อจุลินทรีย์เร่งปุ๋ยหมัก

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ในดินเพื่อนำมาขยายผลสายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

1.4.2 ได้หัวเชื้อเร่งปุ๋ยหมักที่มีประสิทธิภาพ เพื่อลดระยะเวลาในการทำปุ๋ยหมักชีวภาพ

1.4.3 ส่งเสริมให้เกษตรกรใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรในการทำปุ๋ยหมักเพื่อลดต้นทุนในการผลิต

1.4.4 ลดปัญหาสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากการใช้สารเคมีในภาคเกษตรกรรมรวมทั้งปัญหามลพิษ จากการเผาทำลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรภายหลังฤดูเก็บเกี่ยว

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 บทบาทและความสำคัญของจุลินทรีย์ในดิน

จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดินมีความหลากหลายและมีปริมาณมากจะมีหน้าที่และบทบาทต่อกระบวนการต่าง ๆ ในดินแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์บางชนิดก็เป็นประโยชน์บางชนิดก็ให้โทษต่อสิ่งมีชีวิตอื่นที่อาศัยอยู่ในดินเช่น เป็นสาเหตุของโรคพืชและสัตว์ ทำให้เกิดความเสียหายแก่ผลผลิตทางการเกษตรแต่ในสภาพธรรมชาติจุลินทรีย์ที่มีอยู่อย่างหลากหลายจะมีการควบคุมกันเองในวัฏจักรของสิ่งมีชีวิตมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่ทำหน้าที่ป้องกัน กำจัดและยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่นรวมทั้งจุลินทรีย์ที่ให้โทษด้วย

บทบาทที่สำคัญประการหนึ่งของจุลินทรีย์ในดินคือช่วยย่อยสลายสารอินทรีย์จากซากสิ่งมีชีวิตให้กลายเป็นสารอนินทรีย์ (Mineralization) โดยจุลินทรีย์ได้สารอาหารจากซากเหล่านั้นและนำไปใช้ประโยชน์ขณะเดียวกันสารอินทรีย์ที่ถูกย่อยสลายเป็นสารอนินทรีย์แล้วพืชสามารถที่จะดูดซึมไปสร้างเนื้อเยื่อได้ทำให้เกิดการหมุนเวียนธาตุอาหารในดิน ดังนั้นถ้าขาดจุลินทรีย์ในดินจะทำให้ดินขาดสารอาหารส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืช นอกจากนี้ยังมีความสำคัญเกี่ยวข้องกับวัฏจักรของสารต่าง ๆ ในธรรมชาติ เช่น วัฏจักรไนโตรเจน วัฏจักรคาร์บอนและวัฏจักรซัลเฟอร์เป็น (Melillo และคณะ. 2002 ; Berner. 2003)

2.2 จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายสารอินทรีย์คาร์บอน

ในธรรมชาติการย่อยสลายสารอินทรีย์ไปเป็นสารอนินทรีย์โดยเฉพาะการหมุนเวียนของวัฏจักรคาร์บอนนั้นจะอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถย่อยสลายสารประกอบจำพวกลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulose) ได้เป็นสำคัญ (Falkowski และคณะ. 2000) เนื่องจากจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้สามารถสร้างและปลดปล่อยเอนไซม์กลุ่ม Lignocellulytic ได้แก่ เซลลูเลส (cellulase) เฮมิเซลลูเลส (Hemicellulase) และลิกนิน เปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase) (Lee. 1997) มาย่อยสลายเซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูเลสและลิกนิน ตามลำดับ ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่พบมากที่สุด ในธรรมชาติเพราะเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์พืช จุลินทรีย์ดังกล่าวนี้จะพบอยู่ทั่วไปในสภาพธรรมชาติและมีประสิทธิภาพแตกต่างกันไปในการย่อยสลาย โดยจุลินทรีย์ที่มีบทบาทส่วนใหญ่เป็นพวกเชื้อรา แบคทีเรียและแอคติโนมัยซิส (Coughlan และ Ljungdahl. 1988) (ตารางที่ 2.1) สำหรับรายละเอียดของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะกล่าวในหัวข้อถัดไป

ตารางที่ 2.1 ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสได้

เชื้อรา	แบคทีเรีย	แอกติโนมัยซิส
<i>Alternaria</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Micromonospora</i> sp.
<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Cellulomonas</i> sp.	<i>Nocardia</i> sp.
<i>Chaetomium</i> sp.	<i>Clostridium</i> sp.	<i>Streptomyces</i> sp.
<i>Coprinus</i> sp.	<i>Corynebacterium</i> sp.	<i>Thermoactinomyces</i> sp.
<i>Fomes</i> sp.	<i>Cytaphange</i> sp.	<i>Thermomonospora curvata</i>
<i>Fusarium</i> sp.	<i>Polyangium</i> sp.	
<i>Myrothecium</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	
<i>Penicillium</i> sp.	<i>Sporocytophage</i> sp.	
<i>Polyporus</i> sp.	<i>Vibrio</i> sp.	
<i>Rhizoctonia</i> sp.		
<i>Sporutrichum</i> sp.		
<i>Thielavia</i> sp.		
<i>Trametes</i> sp.		
<i>Trichoderma</i> sp.		
<i>Vertricillium</i> sp.		
<i>Zygorhynchus</i> sp.		

ที่มา : Alexander (1977)

2.3 องค์ประกอบของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ในแต่ละปีจะมีวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นจำนวนมากเช่น ฟางข้าว ชังข้าวโพด ทะลายปาล์ม กากกาแฟ เป็นต้น จากการสำรวจวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรพบว่าในแต่ละปีมีปริมาณหลายล้านตัน (ตารางที่ 2.2) หากมีการจัดการที่ไม่เหมาะสมเช่น การเผาทำลายก็จะทำให้เกิดมลพิษในอากาศและทำให้ความอุดมสมบูรณ์ของดินลดลง เกษตรกรจึงต้องพึ่งปุ๋ยเคมีเนื่องจากเห็นผลเร็วแต่การใช้อย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานจะทำให้สมบัติทางกายภาพและเคมีของดินเสียไป (วรรณลดา สุนันทพงษ์ศักดิ์, 2545) ซึ่งองค์ประกอบสำคัญในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลสที่พบมากที่สุดคือ เซลลูโลส รองลงมาคือ เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน (Lewin และ Goldstein, 1991) (ตารางที่ 2.3) เป็นที่ทราบดีว่าสารประกอบในวัสดุเหล่านี้เป็นแหล่งคาร์บอนที่พบมากที่สุดในธรรมชาติและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ ได้อย่างกว้างขวางเช่น ใช้ผลิตเชื้อเพลิง อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม การผลิตอาหาร

สัตว์อุตสาหกรรมการผลิตกระดาษ (Sitton และคณะ. 1979 ; Wong และ Saddler. 1992 ; Bhat. 2000 ; Sun และ Cheng. 2002 ; Beauchemin และคณะ. 2003) รวมถึงนำมาใช้ทำปุ๋ยหมักชีวภาพซึ่งเป็นจุดประสงค์ของงานวิจัยชิ้นนี้ด้วย

ตารางที่ 2.2 ชนิดและปริมาณวัสดุเหลือทิ้งชนิดต่าง ๆ ในประเทศไทย

ชนิด	ปริมาณ (1,000 ตัน/ปี)
1. วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	
ฟางข้าว	43,000
เศษและซังข้าวโพด	1,000
เศษต้นถั่วต่าง ๆ	500
เศษต้นอ้อย	2,000
เศษพืชชนิดต่าง ๆ	1,000
2. วัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรม	
กากอ้อย	6,000
ขี้เลื่อย ขุยมะพร้าว	60
แกลบ	5,000
อื่น ๆ	30
3. วัสดุเหลือทิ้งจากบ้านเรือน	
ขยะเทศบาล (ในเขต กทม. และเมืองหลัก)	3,000
4. วัสดุอื่น ๆ และวัชพืช	
ผักตบชวา	1,000
มูลสัตว์ต่าง ๆ	65,000

ที่มา : วรรณลดดา สุนันทพงษ์ศักดิ์ และ ฉวีวรรณ เหลืองวุฒิวโรจน์ (2540)

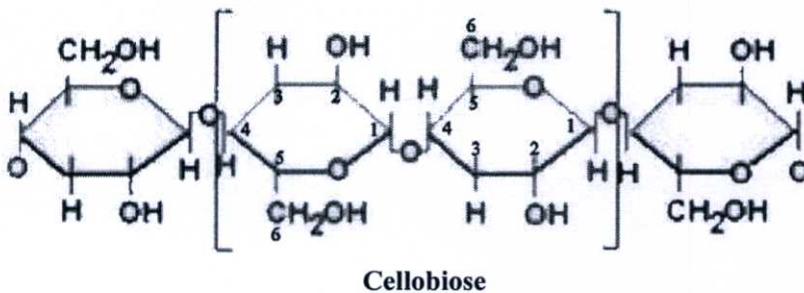
สารประกอบประเภทลิกโนเซลลูโลสเป็นแหล่งของสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ที่พบได้ทั่วไปในรูปของพืชที่เป็นต้นไม้และพืชตระกูลหญ้า ประกอบด้วยส่วนที่สำคัญ 3 ส่วน คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ซึ่งพืชต่างชนิดกันจะประกอบด้วยสารประกอบทั้ง 3 ชนิดในปริมาณที่แตกต่างกัน (Howard และคณะ. 2003) ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ส่วนประกอบในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรบางชนิด

วัสดุ	เซลลูโลส (%)	เฮมิเซลลูโลส (%)	ลิกนิน (%)	เอกสารอ้างอิง
ฟางข้าว	32.1	24	18	Howard. และคณะ (2003)
ซังข้าวโพด	45	35	15	Prasad และคณะ. (2007) ; Mckendry. (2002)
ใบไม้	15-20	80-85	0	Howard และคณะ. (2003)
กากกาแฟ	35	46.3	18.8	Pérez และคณะ. (2002)
ชานอ้อย	32-44	27-32	19-24	Rowell. (1992)
กากปาล์ม	25-40	25-50	10-30	McGinnis และ Shafizaden. (1980)
เปลือกกล้วย	13.2	14.8	14	Prasad และคณะ. (2007)
ไม้เนื้อแข็ง	40-55	24-40	18-25	Malherbe และ Cloete. (2002)
ไม้เนื้ออ่อน	40-55	25-35	25-35	Malherbe และ Cloete. (2002)

2.3.1 เซลลูโลส (Cellulose)

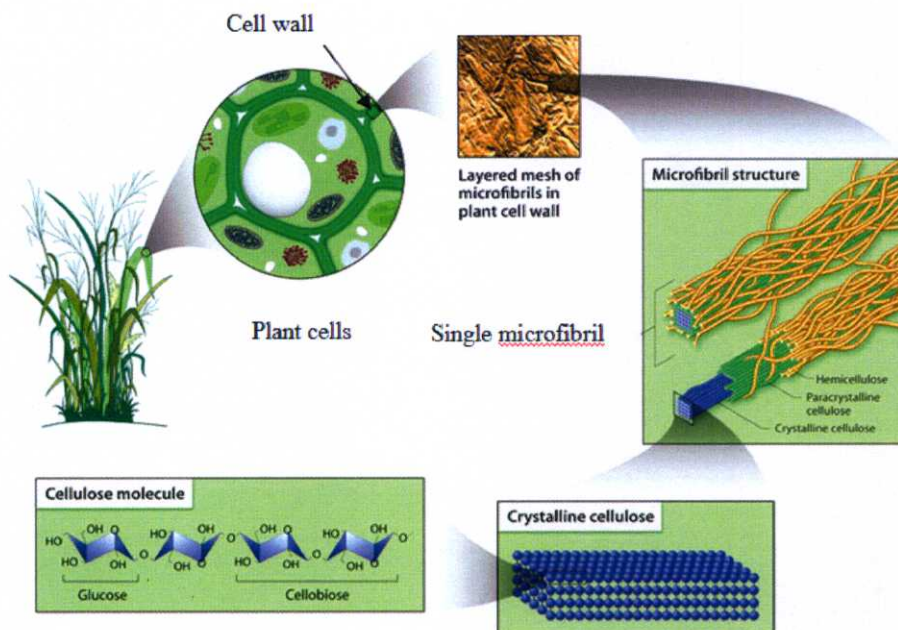
เซลลูโลสเป็นสารอินทรีย์คาร์บอนที่พบมากในผนังเซลล์ของพืช คือประมาณร้อยละ 40 มีโครงสร้างอัดกันแน่นเป็นเส้นตรงไม่มีกิ่ง สูตรโครงสร้างทางเคมีคือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ ประกอบด้วยหน่วยย่อยคือกลูโคส เซลลูโลสแต่ละโมเลกุลจะมีกลูโคสตั้งแต่ 1,400 - 10,000 โมเลกุล แต่ละโมเลกุลเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า 1,4 ไกลโคซิดิก (β - 1,4 glycosidic bond) คือระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ของกลูโคสโมเลกุลหนึ่งจะจับกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของกลูโคสอีกโมเลกุลที่อยู่ถัดไป ในรูปที่ 2.1 แสดงโมเลกุลของเซลโลไบโอส (Cellobiose) ซึ่งก็คือกลูโคส 2 โมเลกุลต่อกันโดยมีส่วนปลายของทั้งสองข้าง คือ Reducing end group (คาร์บอนตำแหน่งที่ 1) ส่วนที่ทำปฏิกิริยาได้ง่ายสุด และ Non-Reducing end group (คาร์บอนตำแหน่งที่ 4) ส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยา (Cowling และ Kirk. 1976)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของเซลลูโลส

ที่มา : West และคณะ (1968)

โดยทั่วไปเซลลูโลสจากธรรมชาติ (native cellulose) จะอยู่ในรูปของลิกโนเซลลูโลส (lingocellulose) คือเซลลูโลสที่เชื่อมอยู่กับโพลีแซคคาไรด์อื่น ๆ เช่น เพคติน เฮมิเซลลูโลส แป้ง โมเลกุลของกลูโคสจะเรียงกันอยู่เป็นมัด ๆ เรียกว่า microfibril เมื่อนำมาขยายดูจะพบว่าประกอบด้วยส่วนที่อยู่รวมกันเป็นกระจุกอัดตัวกันแน่นเรียกว่า (crystalline) และส่วนที่อยู่รวมกันแบบหลวม ๆ (amorphous) (Skopec และคณะ. 2003) (รูปที่ 2.2)



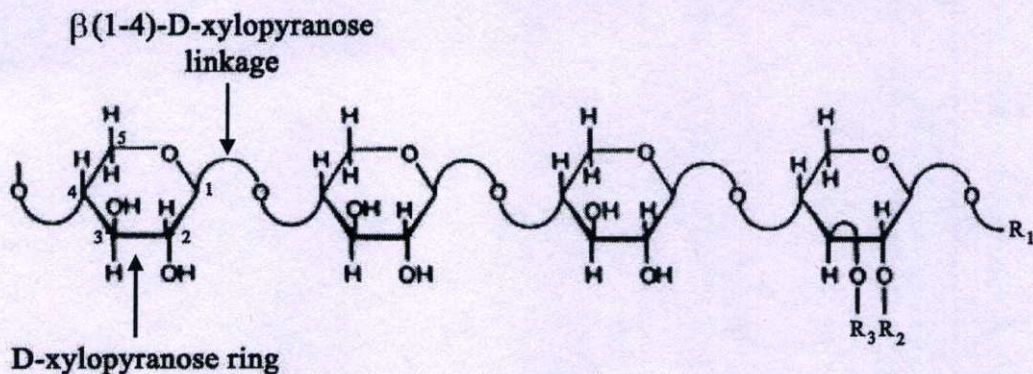
รูปที่ 2.2 เซลลูโลสจากธรรมชาติ (native cellulose)

ที่มา : Rose และ Bennett (1999)

2.3.2 เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose)

เฮมิเซลลูโลส เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลใหญ่ ประเภทเฮเทอโรโพลิแซคคาไรด์ (Heterogeneous Polysaccharides) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์หลายชนิด เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -1,4-ไกลโคซิดิก (รูปที่ 2.3) ทั้งในลักษณะโซ่เส้นตรง (linear chain) และโซ่แขนง (branch chain) ในส่วนที่เป็นแขนงประกอบด้วยน้ำตาล กรดน้ำตาล และอะเซทิลเอสเทอร์ มีผลทำให้โมเลกุลของเฮมิเซลลูโลสมีรูปร่างไม่เป็นระเบียบ (Kirk and Cullen. 1998) มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าเซลลูโลส ซึ่งมี degree of polymerization อยู่ในช่วง 150 - 200 สารประกอบเฮมิเซลลูโลสที่มีในเนื้อไม้ส่วนใหญ่เป็นสารประกอบไซแลน (Pettersen. 1984) ซึ่งจะมีความแตกต่างกันในไม้แต่ละชนิด ไม้เนื้อแข็งเป็นสารประกอบกลูคูโรโนไซแลน (glucuronoxylan) ในไม้เนื้ออ่อนเป็นสารประกอบกาแลคโตกลูโคแมนแนน (galactoglucomannan) หรืออะราบิโนกลูคูโรโนไซแลน (arabionoglucuronoxylan) และในรัชพืชและหญ้าเป็นสารประกอบอะราบิโนไซแลน

(arabinoxylan) (Biely และ Tenkanen. 1998) เหมิเซลลูลอสพบมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูลอส และเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญซึ่งจุลินทรีย์หลายชนิดนำไปใช้ได้ (Soltes. 1983) โดยทั่วไปมีการอยู่ร่วมกับเซลลูลอสและลิกนินในพืช (Araujo และ Ward. 1990) ในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรจะพบเฮมิเซลลูลอสประมาณร้อยละ 20-40 ของน้ำหนักแห้ง (Detroy. 1981)



R1 : ρ Coumaric acid

α -D-Glucuronic acid

α -D-Arabinofuranose

R2 : Acetyl group

α -D-Glucuranopyranose [C_{α} Lignin]

4-O-Methyl- α -D-Glucuranopyranose [C_{α} Lignin]

α -L-Arabinofuranose [C_{α} and C_{δ} Lignin, Ferulic acid, Acetyl group, ρ Coumaric acid]

C_{α} Lignin

R3 : Acetyl group

α -L-Arabinofuranose [C_{α} and C_{δ} Lignin, Ferulic acid, Acetyl group, ρ Coumaric acid]

β -D-Galactopyranosyl (1-5) α -L-Arabinofuranose

β -D-Xylopyranosyl (1-2) α -L-Arabinofuranose

α -L-Arabinofuranosyl (1-2, 1-3, 1-2,3 Arabinofuranose) n

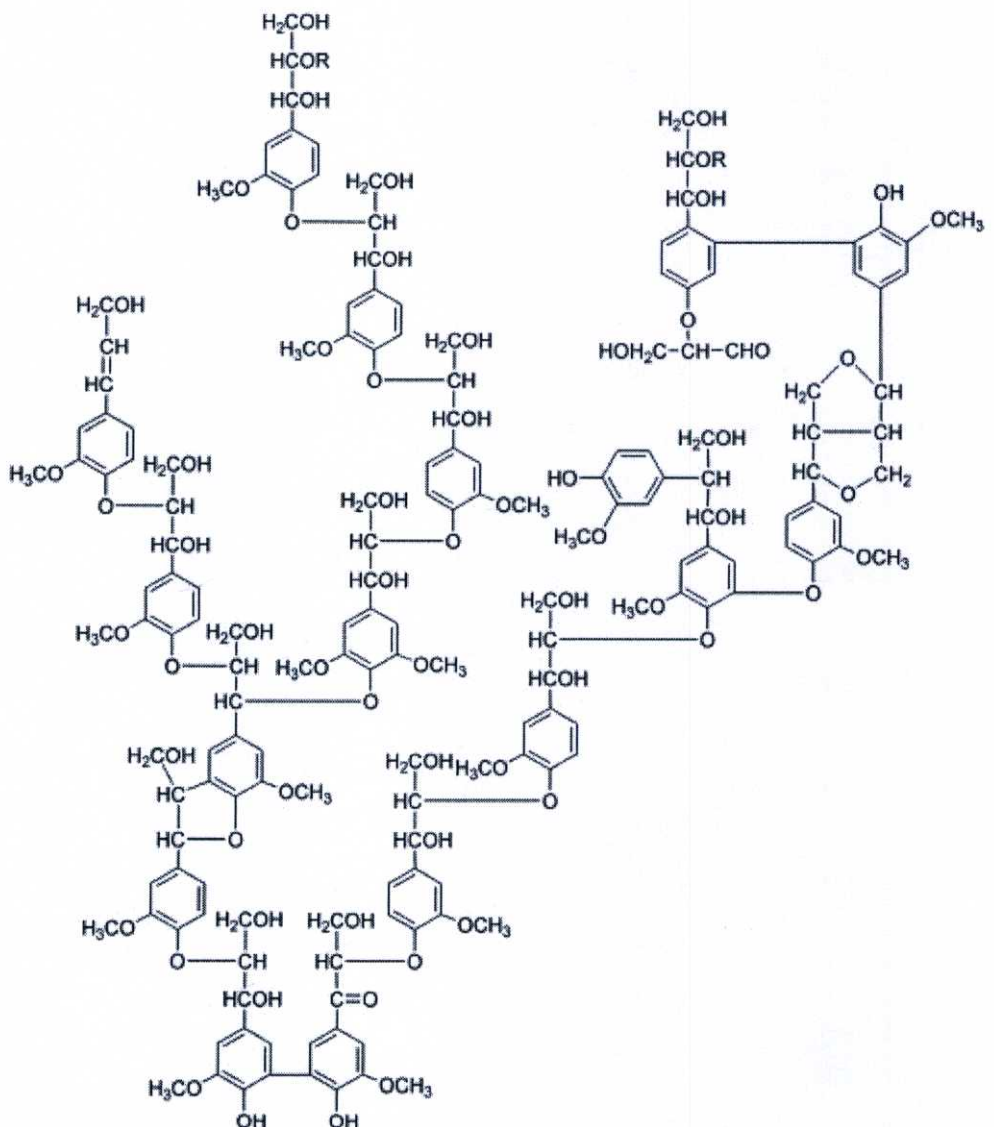
β -D- Galactopyranosyl (1-4) D-Xylopyranosyl (1-2) α -L-Arabinofuranose

รูปที่ 2.3 โครงสร้างของไซแลน

ที่มา : Kulkarni และคณะ (1999)

2.3.3 ลิกนิน (Lignin)

ลิกนินเป็นองค์ประกอบของพืชที่พบมารองจากเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส จะพบมากในไม้เนื้อแข็ง พืชที่มีอายุมากจะมีลิกนินมากกว่าพืชที่มีอายุน้อย โดยทั่วไปจะพบประมาณร้อยละ 15-30 (Kirk และ Farrell, 1987) โครงสร้างเป็นสารประกอบจำพวกอะโรมาติก (aromatic) (รูปที่ 2.4) ย่อยสลายค่อนข้างยาก ถึงแม้ว่าในดินโดยทั่วไปจะมีจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายลิกนินได้ อาศัยอยู่เป็นจำนวนมากแต่อัตรการย่อยสลายจะเป็นไปได้ช้ามาก บางครั้งต้องใช้เวลา 6-7 เดือน ลิกนินจึงจะถูกย่อยสลายไปร้อยละ 50 (ปรีชา เกียรติกระจาย และ ทรงกลด จารุสมบัติ, 2528)



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของลิกนิน

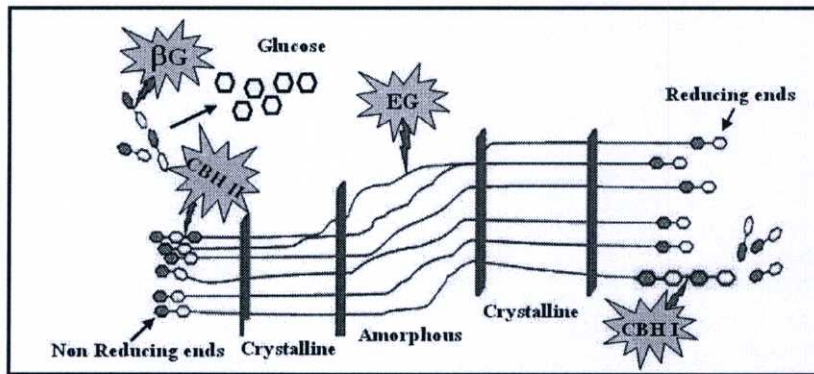
ที่มา : http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/Thumb/e/ee/Lignin_structure.svg

2.4 เอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลส

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลสที่สำคัญมี 2 กลุ่ม คือ เอนไซม์ในกลุ่มเซลลูโลไลติก (cellulolytic) และไซลานอลิติก (xylanolytic) โดยลักษณะการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองกลุ่มนี้จำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์หลายชนิดทำงานร่วมกัน (synergistic enzyme หรือ multiple enzyme) ดังนี้ (Halliwell และ Griffin. 1973) (รูปที่ 2.5)

2.4.1 เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase)

เซลลูเลสประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดทำหน้าที่ร่วมกันในการสลายเซลลูโลส จากการศึกษาาระบบเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งมีหลายองค์ประกอบในการทำปฏิกิริยาสามารถแบ่งเอนไซม์เซลลูเลสได้ 3 ชนิด โดยเรียกเอนไซม์ในกลุ่มนี้ว่า เซลลูโลไลติก (cellulolytic) (Fan และ Lee. 1983; Montenecourt. 1983; Enari. 1983; Ryu และคณะ. 1984)



รูปที่ 2.5 กลไกการย่อยสลายเซลลูโลสโดยการทำงานของระบบเอนไซม์เซลลูเลส

EG คือ endoglucanase, CBH I และ CBH II คือ cellobiohydrolase และ β G คือ β -glucosidase
ที่มา : Pérez และคณะ (2002)

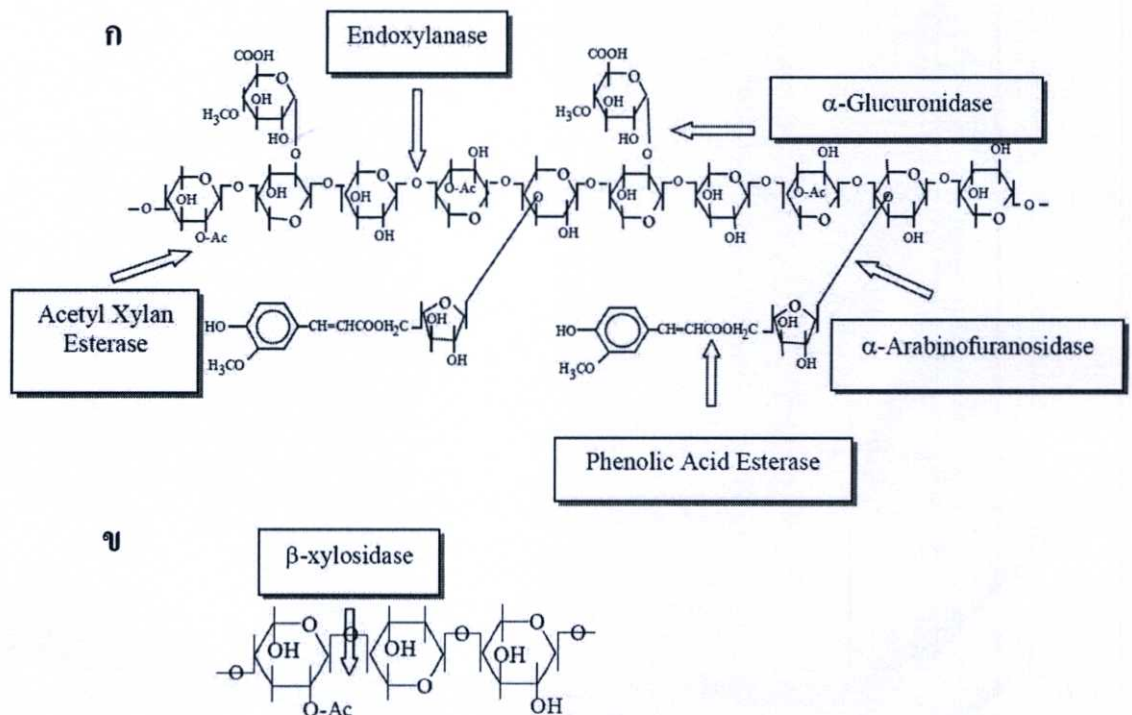
2.4.1.1 endoglucanase (1,4 β -D-glucan 4-glucanohydrolase, E.C. 3.2.1.4) ทำหน้าที่ตัดพันธะเบต้า 1,4 ไกลโคซิดิก ภายในสายเซลลูโลสบริเวณที่เป็น amorphous cellulose celloextrins และอนุพันธ์ของเซลลูโลส (substituted cellulose) เช่น เซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับกรดฟอสเฟอริก ได้แก่ carboxymethyl cellulose (CMC) และ hydroxyethyl cellulose (HEC) แต่ไม่สามารถย่อยสลาย crystalline cellulose และเซลโลไบโอสได้ โดยเอนไซม์นี้จะตัดพันธะแบบสุ่มได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคส เซลโลไบโอสและโอลิโกแซคคาไรด์

2.4.1.2 cellobiohydrolase (1,4 β -D-glucan 4-glucobiohydrolase, E.C. 3.2.1.91) หรือ exoglucanase จัดจำแนกเป็น 2 คลาส คือ CBH I และ CBH II โดย CBH I จะย่อยเซลโลไบโอสไปเป็นกลูโคสทางด้านปลายสาย reducing end ในขณะที่ CBH II จะย่อยสายของเซลลูโลสทางด้านปลาย non reducing end ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคสและเซลโลไบโอส

2.4.1.3 β -glucosidase, β G (β -D-glucosidase glucohydrolase, E.C. 3.2.1.21) หรือ เซลโลไบเอส ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสและ celloligosaccharides ได้น้ำตาลกลูโคสแต่ไม่สามารถย่อยสลายโครงสร้างของเซลลูโลส และ cellodextrins สายยาวได้ (Wood และ Wilson. 1984)

2.4.2 เอนไซม์ไซลันเนส (xylanase)

สารประกอบเฮมิเซลลูโลสที่มีในเนื้อไม้ส่วนใหญ่เป็นสารประกอบไซแลน ดังนั้น เอนไซม์ที่ย่อยสารเฮมิเซลลูโลสส่วนใหญ่จึงเป็นเอนไซม์ที่ย่อยไซแลนหรือเอนไซม์ไซแลนเนส ซึ่งสามารถจำแนกได้เป็นเอนไซม์ไซแลนเนส (Endo- β -1,4 xylanase) มีหน้าที่ในการตัดพันธะเบต้า 1,4 ไกลโคซิดิก (β -1,4 glycosidic) ภายในสายโซ่หลักของโมเลกุลไซแลนและเอนไซม์เบต้า-ไซโลซิเดส (β -xylosidase) จะทำหน้าที่ในการย่อยไซโลไบโอส (xylobiose) หรือไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (xylooligosaccharide) ได้เป็นน้ำตาลไซโลส นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ชนิดอื่นที่เข้าทำปฏิกิริยาที่แขนงข้าง (side chain) ของโมเลกุลไซแลน ได้แก่ เอนไซม์แอลฟา-อาราบินอฟูราโนซิเดส (α -arabino furanosidase) และเอนไซม์อะเซทิลไซแลนเอสเตอเรส (acetyl xylanesterase) เพื่อที่จะช่วยให้เอนไซม์ไซแลนเนสหรือเอนไซม์เบต้า-ไซโลซิเดสเข้าย่อยสายโซ่หลักได้ง่ายขึ้น (Béguin and Aukert. 1994 ; Thompson. 1983) ดังแสดงในรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 กลไกการย่อยสลายไซแลนโดยการทำงานของระบบเอนไซม์ไซแลนเนส
(ก) การย่อยสลายโมเลกุลไซแลนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง (ข) การย่อยไซโลโอลิโกแซคคาไรด์
โดยเอนไซม์เบต้า-ไซโลซิเดส

ที่มา : Collins และคณะ (2005)

2.5 จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลส

จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มเซลลูโลโลติกและไซลาโนโลติกได้ มีทั้งชนิดที่เป็นแอโรบ (aerobes) และแอนแอโรบ (anaerobes) รวมทั้งพวกที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophiles) และพวกที่ชอบอุณหภูมิสูง (thermophiles) (Tomme และคณะ. 1995) สำหรับการคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการทำปุ๋ยหมักจากเศษวัสดุนั้นนอกจากจะพิจารณาจากความสามารถในการผลิตเอนไซม์ดังกล่าวได้แล้วจะต้องสามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูงได้ด้วยเนื่องจากปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดขึ้นในกองปุ๋ยหมักทำให้ปุ๋ยหมักมีอุณหภูมิสูงขึ้นจนถึง 50-60 องศาเซลเซียส (เสียงแจ้ว พิริยพจนต์ และ นวลจันทร์ ภาสดา. 2540) เสียงแจ้ว พิริยพจนต์ และ พิทยากร ลิ้มทอง. (2537) ได้ทำการศึกษาจุลินทรีย์ในกองปุ๋ยหมักและได้ทำการจัดจำแนกเป็น 3 กลุ่มหลัก ๆ ดังนี้

2.5.1 เชื้อรา (fungi)

เชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์กลุ่มเซลลูโลโลติกและไซลาโนโลติกได้มีหลายชนิด ซึ่งสามารถจัดกลุ่มได้เป็น white rot fungi, brown rot fungi และ soft rot fungi เช่น *Aspergillus niger*, *Neurospora crassa*, *Penicillium* sp., *Scytalidium thermophilum*, *A. japonicus* และ *Trichoderma reesei* Rut C30 (Jeffries. 1994) *T. reesei* เป็นเชื้อราที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสได้เป็นอย่างดีและมีการศึกษากันอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งนำมาใช้ผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรม อย่างไรก็ตาม *T. reesei* ก็มีข้อจำกัดในการย่อยสารประกอบลิกโนเซลลูโลสคือ ไม่สามารถย่อยลิกนินได้อย่างสมบูรณ์ เชื้อรากลุ่มหนึ่งที่ย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลสได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด คือ เชื้อราขาว (white rot fungi) (Shoham และคณะ. 1999)

การคัดแยกเชื้อราจากธรรมชาติมักจะตรวจพบเชื้อราเสมอแต่ชนิดของเชื้อราจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับวัสดุที่ทำการคัดแยก โดยทั่วไปจะคัดแยกเชื้อราในกลุ่มนี้ได้จากดินที่มีการทับถมของอินทรีย์วัตถุเช่น ในป่า มูลของสัตว์เคี้ยวเอื้อง หรือแม้แต่ในกองปุ๋ยหมักก็มีการงานวิจัยที่ศึกษาเพื่อคัดเลือกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสารประกอบลิกโนเซลลูโลสอย่างกว้างขวาง เนื่องจากสภาพแวดล้อมภายในกองปุ๋ยหมักตามธรรมชาตินั้นเมื่อมีการย่อยสลายเกิดขึ้นอุณหภูมิภายในกองปุ๋ยก็จะสูงขึ้น จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มักจะมีความสามารถในการทนอุณหภูมิสูงด้วย โดยทั่วไปมักตรวจพบเชื้อราเจริญอยู่ผิวบนของกองปุ๋ยหมักซึ่งมีอุณหภูมิและมีความชื้นต่ำกว่าในภายในกองปุ๋ย จากการศึกษาพบว่าในช่วงอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สามารถพบเชื้อราได้ แต่เมื่ออุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จะไม่พบเชื้อราเลย และเมื่ออยู่ในสภาพที่แห้งจะพบว่าที่อุณหภูมิ 62 - 65 องศาเซลเซียส ยังสามารถตรวจพบเชื้อราได้ (Charest และคณะ. 2004) ในระยะแรกของการหมักอุณหภูมิในกองปุ๋ยหมักยังไม่สูงมากนักจะพบเชื้อราพวก *Geotrichum candidum* และ *Aspergillus fumigatus* เมื่ออุณหภูมิสูงถึง 45-55 องศาเซลเซียส มักจะตรวจพบเชื้อราพวก

Cladosporium sp., *Aspergillus* sp. และ *Mucor* sp. เมื่ออุณหภูมิสูงกว่านี้อาจจะพบเชื้อราพวก *Penicillium duponti* (ธงชัย มาลา. 2544 ; Epstein. 1997)

2.5.2 แบคทีเรีย (bacteria)

เป็นจุลินทรีย์ที่พบมากที่สุดในกองปุ๋ยหมักคือประมาณร้อยละ 80 - 90 ของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบซึ่งจุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบในกองปุ๋ยหมักมีประมาณ 2.3×10^8 เซลล์ต่อกรัม (Benitez และคณะ. 1999) ในระยะแรกของการหมักอุณหภูมิภายในกองปุ๋ยหมักจะไม่สูงมากนักแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่พบมากจะเป็นพวก *Pseudomonas* sp. , *Cellulomonas* sp. , *Flavobacterium* sp. , *Micrococcus* sp. และ *Achromobacter* sp. ต่อมาอุณหภูมิภายในกองปุ๋ยหมักจะสูงมากขึ้นในช่วง 50-55 องศาเซลเซียส แบคทีเรียที่เจริญได้ดีจะเป็นพวก *Bacillus* sp. ในบางกรณีอุณหภูมิอาจสูงถึง 65-70 องศาเซลเซียส แบคทีเรียที่เจริญได้และสามารถทนความร้อนสูงได้แก่ *Thermus* sp. และ *Bacillus* sp. สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสและสามารถสร้างสปอร์ได้นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียที่สามารถสร้างสปอร์ได้เช่นกันแต่เจริญในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน ได้แก่ *Clostridium* sp. (Katz และ Reese. 1968)

2.5.3 แอคติโนมัยซิส (actinomycetes)

แอคติโนมัยซิสจะมีอัตราการเจริญเติบโตช้ากว่าเชื้อราและแบคทีเรีย เจริญได้ดีใน สภาพที่มีอากาศพอเพียง ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 65 - 75 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิสูงเกินกว่า 75 องศาเซลเซียส (Tuomela และคณะ. 2000) มักจะไม่พบเชื้อแอคติโนมัยซิส ลักษณะของเชื้อที่พบบนกองปุ๋ยหมักจะเจริญเป็นกลุ่มเห็นเป็นจุดสีขาวคล้าย ๆ ผงปูน เชื้อแอคติโนมัยซิสมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายอินทรีย์สาร เช่น เซลลูโลส ลิกนิน ไคติน และ โปรตีนที่มีอยู่ในกองปุ๋ยหมัก แอคติโนมัยซิสที่มักพบเสมอในกองปุ๋ยหมัก ได้แก่ *Nocardia*, *Streptomyces*, *Thermoactinomyces* และ *Micromonospora* ซึ่งเป็นกลุ่มที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสออกมาย่อยเซลลูโลสได้อย่างมีประสิทธิภาพและทนอุณหภูมิสูง (Waksman และคณะ. 1939 ; Strom. 1985) นอกจากนี้เชื้อแอคติโนมัยซิสบางชนิดสามารถสร้างสารปฏิชีวนะออกมาทำลายเชื้อโรคพืช และการเกิดอุณหภูมิที่สูงในกองปุ๋ยหมักสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคและทำลายไข่แมลงศัตรูพืชได้ เป็นต้น (Jan และ Chen. 2003)

2.6 การคัดแยกและการคัดเลือกจุลินทรีย์

2.6.1 การคัดแยก

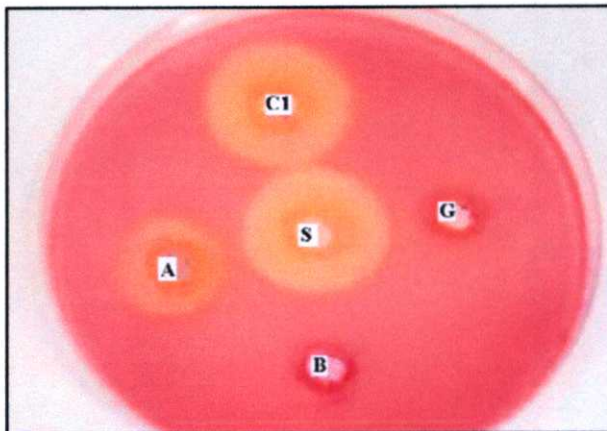
ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากธรรมชาติเพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้นั้นมีวิธีการทดสอบที่หลากหลาย รวมถึงส่วนประกอบที่จำเป็นในอาหารที่ใช้ในการคัดแยกจุลินทรีย์กลุ่มนี้ซึ่งก็คือสับสเตรตที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนก็จะแตกต่างกันไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการทดลอง (Sheehan และ Himmel, 1999) จากที่กล่าวไปแล้วในข้างต้นว่าการ

ย่อยสลายเซลลูโลสต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ 3 ชนิด คือ endoglucanase, exoglucanase และ β -glucosidase โดยส่วนใหญ่วิธีการพื้นฐานที่ใช้ในการตรวจสอบมี 2 วิธีหลัก ๆ คือ การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพียงบางชนิดและการวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด (total cellulase) จากตารางที่ 2.4 แสดงชนิดของสับสเตรตที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการคัดแยกจุลินทรีย์ย่อยเซลลูโลส

สำหรับการคัดแยกเบื้องต้นในระดับห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่จะใช้วิธีที่ง่ายและให้ผลการทดสอบที่รวดเร็วเช่นงานวิจัยของ Mizukoshi และคณะ (1977) ใช้กระดาษกรองซึ่งมีโครงสร้างใกล้เคียงกับสารประกอบเซลลูโลสในธรรมชาติเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเริ่มจากนำตัวอย่างดินประมาณ 5 กรัม ใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ วางกระดาษกรองทับบนตัวอย่างดินแล้วจึงเทอาหารเลี้ยงเชื้อให้ชุ่มกระดาษกรอง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 - 7 วัน แยกโคโลนีที่สามารถเจริญบนกระดาษกรองไปแยกเชื้อให้บริสุทธิ์เพื่อทำการทดลองในขั้นต่อไป

การคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสด้วยอาหารแข็งที่มี carboxymethyl cellulose (CMC) เป็นแหล่งคาร์บอนและทดสอบโดยวิธี congo red test จากนั้นตรวจผลการย่อยเซลลูโลสจากการเกิดวงใส (clear zone) รอบโคโลนีของจุลินทรีย์เป็นอีกวิธีหนึ่งที่สะดวกและค่อนข้างมีประสิทธิภาพ Teacher และ Wood (1982) ; wood และ Bhat (1988) ได้ทำการศึกษาผลของสีย้อม congo red เพื่อนำมาใช้วิเคราะห์การย่อยสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ จากการทดลองพบว่าสีของ congo red จะจับกับโพลีแซคคาไรด์ที่ไม่ถูกย่อยเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ทำให้สามารถแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยและไม่ย่อยออกจากกันได้ โดยจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยเซลลูโลสได้จะปรากฏวงใสรอบโคโลนีอย่างชัดเจน วิธีนี้เหมาะสำหรับการคัดแยกในเบื้องต้นและจำนวนตัวอย่างที่ต้องการคัดแยกเชื้อมีหลายตัวอย่าง (Sharrock. 1988) เช่นในงานวิจัยของ Ajay และคณะ (2007) ได้ทำการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Phlebia gigantea* ผู้วิจัยได้ทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของ *P. gigantea* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกันไป จากนั้นนำน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อมาปั่นเหวี่ยงเพื่อนำส่วนใส (crude enzyme) มาทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็ง CMC โดยเปรียบเทียบกับเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา *T. reesei*. RUT C30 ที่ผลิตทางการค้า จากการทดลองพบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี CMC (C1) และ Avicel (A) เป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลการเกิดวงใสที่มีขนาดใกล้เคียงกับเอนไซม์จาก *T. reesei*. RUT C30 (S) (รูปที่ 2.7) จากนั้นทำการทดสอบเพื่อยืนยันผลการทดลองด้วยการวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดย *P. gigantea* ในอาหารเหลว พบว่าผลการทดลองสอดคล้องกันโดยในอาหารที่มี CMC มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 112 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนในอาหารที่ Avicel มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 2.8 ยูนิตต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ CMC ยังใช้เป็นสับสเตรตในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์

endoglucanase ในเชิงปริมาณด้วย ในบางครั้งจึงเรียกเอนไซม์ชนิดนี้ว่า CMCase (Percival และคณะ. 2006)



รูปที่ 2.7 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Phlebia gigantea* บนอาหารแข็ง CMC และทดสอบด้วยวิธี congo red
ที่มา : Ajay และคณะ (2007)

Limtong และคณะ. (1990) คัดแยกเชื้อราและแอคติโนมัยซิสได้จำนวนทั้งสิ้น 1,297 และ 729 ไอโซเลท ตามลำดับ จากตัวอย่างดิน พืช ปุ๋ยหมักและปุ๋ยคอก ในแถบภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกและภาคใต้ของประเทศไทย จำนวนทั้งสิ้น 1,579 ตัวอย่าง โดยการคัดแยกเบื้องต้นในอาหารแข็งที่มี walsyth cellulose เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 วัน คัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อย walsyth cellulose โดยสังเกตจากวงใสรอบโคโลนีของเชื้อ จากขั้นตอนนี้ทำให้คัดเลือกเชื้อราและแอคติโนมัยซิสได้จำนวน 164 และ 70 ไอโซเลท ตามลำดับ โดยมีขนาดความกว้างของวงใสอยู่ในช่วง 6.5 -15.0 มิลลิเมตร

นอกจากนี้ในบางรายงานใช้อาหารเหลวในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสดังเช่นรายงานของ Fujio และ Moo Young (1980) ได้ทำการแยกเชื้อราจากดินปุ๋ยหมักและมูลสัตว์โดยใช้แหล่งเซลลูโลสต่าง ๆ คือ กระดาษกรอง เซลลูโลสผง กระดาษหนังสือพิมพ์แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีการเขย่าให้อากาศ และรายงานในปีเดียวกันของ Tanaka และคณะ (1986) ก็ได้นำตัวอย่างดินมาทำการเจือจางในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมี crystalline cellulose เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 2.4 ชนิดของสับสเตรตที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการศึกษาความสามารถในการย่อยโดย เอนไซม์เซลลูเลสและวิธีการวิเคราะห์

เอนไซม์	สับสเตรต	วิธีการวิเคราะห์
Total cellulase	Cotton	1. Estimation of cellulose residue 2. Reducing sugar released 3. Weight loss 4. Loss in tensile strength
	Filter paper, Hydrocellulose, Avicel and α -cellulose	1. Release of reducing sugars
	Dyed Avicel	1. Release of dyed soluble fragments
Endo- 1,4- β -D - glucanase (endoglucanase, CMcellulase, endocellulase)	Carboxymethyl cellulose (CMC)	1. Release of reducing sugars
	Hydroxyethylcellulose (HEC)	2. Decrease in viscosity
	Substituted and unsubstituted cellooligosaccharides	1. Increase in reducing power 2. Analysis by HPLC
Exo - 1,4- β -D- glucanase (cellobiohydrolase, exocellulase or Avicelase)	Cotton	1. Swelling in alkali
	Amorphous cellulose	2. release of reducing sugars
	Avicel	1. Release of reducing sugars
	Hydrocellulose	2. Release of dyed cellobiose
	Dyed Avicel	
β - Glucosidase or Cellobiase	Amorphous cellulose	1. Release of reducing sugar 2. Decrease in turbidity
	Substituted and unsubstituted cellooligosaccharides	1. Increase in reducing power 2. Analysis by HPLC
	Cellobiose	1. Release of glucose
	Cello-oligosaccharides	2. Increase in reducing power
	o - or p -Nitrophenyl- β -D- glucoside	1. Release of o - or p - nitrophenol

ที่มา : BHAT และ BHAT (1997)

สำหรับอุณหภูมิที่ใช้ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ของการทดลองว่า ต้องการจุลินทรีย์กลุ่มใดซึ่งแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ จุลินทรีย์กลุ่มที่เจริญที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophile) มักจะใช้อุณหภูมิสำหรับการบ่มเชื้อประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์อีกกลุ่มหนึ่งได้แก่จุลินทรีย์ที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิสูง (thermophile) มักจะใช้อุณหภูมิสำหรับการบ่มเชื้อตั้งแต่ 45 - 60 องศาเซลเซียส (Oso. 1978 ; Maheshwari และคณะ. 2000)

2.6.2 การคัดเลือก

สำหรับการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยเซลลูโลสมีหลายวิธีด้วยกัน เช่น การใช้ HPLC การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ การแพร่ของสีในอาหาร เป็นต้น

Poincelot และ Dry (1972) ใช้วิธีเติมสีให้เกาะอยู่กับโครงสร้างของเซลลูโลสโดยการนำเอากระดาษกรองข้อมด้วยสี Remazol Brilliant Blue R (RBBR) จากนั้นเพาะเชื้อบนผิวหน้าของอาหารหากเชื้อมีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสก็จะทำให้สีละลายออกมา ความเข้มของสีจะเป็นตัวบ่งบอกถึงความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของเซลล์ได้

Coutls และ Smith (1976) ใช้อาหาร Modified Peterson medium โดยมี cellulose azure (Calbiochem, San Diego Calif.) ซึ่งเป็นเซลลูโลสที่มีโครงสร้างติดอยู่กับสีเป็นแหล่งคาร์บอนจากนั้นเพาะเชื้อลงบนผิวหน้าของอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สำหรับเชื้อ mesophile และ thermophile ตามลำดับ ความเข้มสีและความเร็วในการแพร่ของสีน้ำเงินจะบ่งบอกถึงความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ

Fogarty และ Kelly (1980) ได้กล่าวเพิ่มเติมถึงคุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่จะถูกคัดเลือกมาเพื่อใช้ในการผลิตเอนไซม์ว่าจะต้องผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมากและใช้เวลาในการผลิตเอนไซม์สั้นกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น จุลินทรีย์ต้องเจริญและผลิตเอนไซม์ในวัตถุดิบที่หาได้ง่าย ราคาถูก มีองค์ประกอบไม่ซับซ้อน แยกจากน้ำหมักได้ง่าย ไม่ก่อโรคและไม่ผลิตสารพิษ

2.7 การผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์เร่งปุ๋ยหมัก

เนื่องจากกระบวนการเกิดปุ๋ยหมักเป็นการย่อยสลายเศษพืชโดยกิจกรรมของจุลินทรีย์ถ้าหากมีจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเศษพืชเหล่านี้ได้ดีและมีอยู่เป็นปริมาณมากแล้วจะช่วยให้เกิดปุ๋ยหมักได้รวดเร็วขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตปุ๋ยหมักในระดับอุตสาหกรรมซึ่งต้องใช้กระบวนการย่อยสลายเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว หัวเชื้อจุลินทรีย์เร่งปุ๋ยหมักจึงมีความจำเป็นมาก ในหัวเชื้อจุลินทรีย์เร่งปุ๋ยหมักจะประกอบไปด้วยเชื้อจุลินทรีย์ปริมาณมากและเป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายเศษพืช อาจเป็นจุลินทรีย์ชนิดเดียวหรือรวมกันหลายชนิด หัวเชื้อจุลินทรีย์ควรจะผสมอยู่ในสารผสมที่เหมาะสมเพื่อให้เชื้อสามารถเริ่มกิจกรรมได้ทันทีเมื่อผสมลงในกองปุ๋ยหมัก การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้วให้ได้ปริมาณมากสามารถทำได้โดยเลี้ยงใน

ถังหมัก (fermenter) หรือในภาชนะอื่น ๆ เช่น เชื้อราและแอกติโนมัยซีตอาจเลี้ยงในถาด ส่วนแบคทีเรียควรเลี้ยงในถังหมัก เป็นต้น นอกจากนี้สิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงคืออาหารได้แก่แหล่งคาร์บอนซึ่งเป็นแหล่งของพลังงานที่สำคัญมากและเซลล์ต้องการเป็นปริมาณมากอาจได้มาจากเซลลูโลสหรือน้ำตาล เช่น ซูโครสหรือกลูโคส และอาจมีการเติมสารเร่งการเจริญเติบโต (growth factor) รวมทั้งการปรับสภาวะให้เหมาะสมกับชนิดของจุลินทรีย์ เช่น ค่าพีเอช อุณหภูมิและความชื้น เป็นต้น (ภาวนา ลิกขนานนท์ และคณะ. 2549)

2.8 การออกแบบพื้นที่การตอบสนอง (Response Surface Methodology , RSM)

การออกแบบพื้นที่การตอบสนองเป็นเทคนิคหนึ่งที่น่าจะมีประโยชน์อย่างมากต่อการออกแบบในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ สามารถประยุกต์ได้กับการพัฒนาทั้งสูตรการผลิตและกระบวนการผลิตสำหรับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการพัฒนา สามารถหาจุดเหมาะสมจากข้อมูลที่ได้จากการทดลองในรูปแบบการวางแผนการทดลองต่าง ๆ ทำให้นักพัฒนาผลิตภัณฑ์สามารถตัดสินใจจุดที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นแนวทางในการปฏิบัติงานในการผลิตระดับอุตสาหกรรม (ไพโรจน์ วิริยจารี. 2544)

วิธีการออกแบบพื้นที่การตอบสนองเป็นการรวบรวมเอาเทคนิคทั้งทางคณิตศาสตร์และทางสถิติที่มีประโยชน์ต่อการสร้างแบบจำลองและการวิเคราะห์ปัญหา เพื่อหาจุดที่ทำให้ผลผลิตของกระบวนการมีค่ามากที่สุด ซึ่งวิธีนี้เหมาะกับการทดลองที่มีปัจจัยหลาย ๆ ปัจจัย (วีรเทพ เกลิมสมิทธิชัย. 2550) ในทางสถิติการหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร 2 ประเภทคือ ตัวแปรตาม (Dependent Variable : นิยมใช้สัญลักษณ์ Y) และตัวแปรอิสระ (Independent Variable : นิยมใช้สัญลักษณ์ X) ซึ่งเรียกว่า ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (Regression Coefficient) การหาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยจะทำได้หลังจากที่ได้สร้างหรือกำหนดรูปแบบของความสัมพันธ์ (Model) ซึ่งในการออกแบบพื้นที่การตอบสนองนั้นมีรูปแบบของแบบจำลองอยู่ 4 แบบจำลองคือ Linear model, Linear + interaction model, Linear + square model และ Full quadratic model การเลือกใช้แบบจำลองจึงควรจะต้องมีหลักการในการเลือกตัวแบบจำลองที่มีความเหมาะสมโดยพิจารณาจากค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Standard Error: SE) และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of Determination : R^2) ซึ่งมีหลักการดังนี้ (ศิริชัย พงษ์วิชัย. 2548)

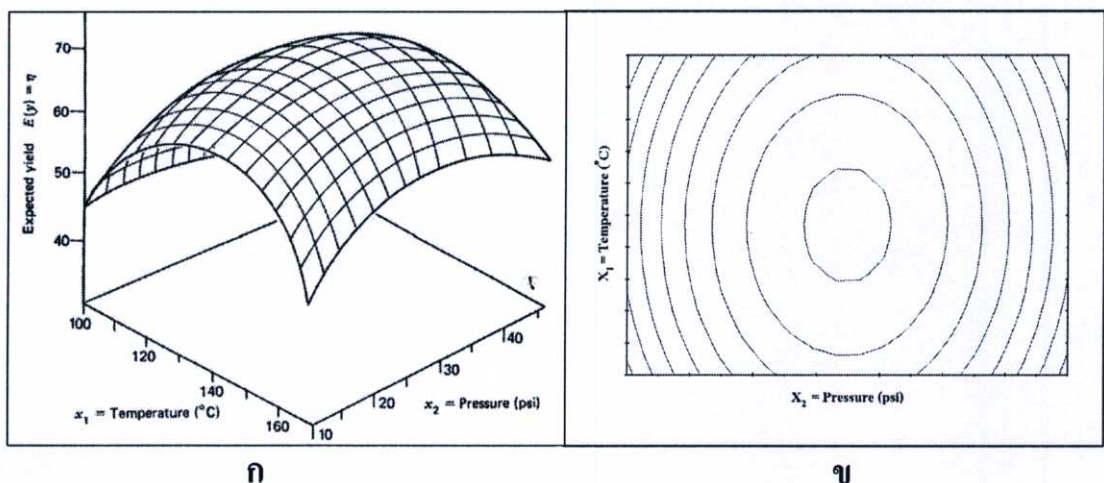
2.8.1 พิจารณาค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Standard Error: SE)

ถ้ามูลค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานมีค่าน้อย แสดงว่าตัวแบบจำลองที่นำมาใช้มีความเหมาะสมค่อนข้างมาก แต่ถ้าค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานมีค่ามาก แสดงว่าตัวแบบจำลองที่นำมาใช้มีความเหมาะสมน้อยมาก และถ้าในกรณีที่ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานมีค่าเท่าศูนย์ แสดงว่าตัวแบบจำลองมีความเหมาะสมดีมาก

2.8.2 การพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of Determination : R^2)

ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจมีค่าอยู่ระหว่าง 0 - 1 ตัวแบบจำลองที่ดีควรจะได้อัตราสัมประสิทธิ์การตัดสินใจสูง ๆ นั่นคือมีค่าใกล้เคียง 1 หรือ เท่ากับ 1 ซึ่งแสดงว่าตัวแปรอิสระที่อยู่ในตัวแบบจำลองสามารถอธิบายการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตามได้ดี อาจสรุปได้ว่าค่า R^2 เป็นการวัดความใกล้เคียงของเส้นถดถอยของตัวอย่างกับค่าสังเกตค่าต่าง ๆ ของตัวอย่าง ถ้าค่า R^2 มีค่ามากแสดงว่าเส้นถดถอยจะผ่านเข้าใกล้ค่าสังเกตค่าต่าง ๆ มากกว่าค่า R^2 ที่มีค่าน้อยกว่า

ในการหาสถานะที่เหมาะสมในการผลิตโดยใช้การวิเคราะห์แบบ Multiple regression analysis หากตัวแปรใดที่มีผลต่อค่าตอบสนองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ตัวแปรนั้นจะปรากฏในสมการ สมการที่ได้อาจเป็นสมการกำลังหนึ่ง (first order model) ที่มีลักษณะกราฟเป็นเส้นตรงหรือสมการกำลังสอง (second order model) ที่มีหลายเทอม และจากสมการที่สร้างขึ้นนี้สามารถนำมาสร้างกราฟ 3 มิติ ที่เรียกว่า Response surface plot (รูปที่ 2.7A) ซึ่งแสดงระดับของตัวแปรในแนวระนาบและแสดงค่าตอบสนองในแนวแกนตั้งหรือสร้างกราฟ 2 มิติ ที่เรียกว่า Contour plot (รูปที่ 2.7B) ซึ่งแสดงค่าตอบสนองในรูปเส้นกราฟหลายเส้น กราฟที่ได้มีประโยชน์ในการอธิบายผลของตัวแปรที่ศึกษาต่อค่าตอบสนองและความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรที่ศึกษา รวมทั้งอธิบายผลร่วมของตัวแปรที่ศึกษาต่อค่าตอบสนอง (Roberto. 2000) การหาจุดที่เหมาะสมนั้น ต้องลุ่มทดลองเพื่อหาช่วงที่มีจุดเหมาะสม หากพบว่าผลที่ได้ยังห่างจากจุดที่เหมาะสม ต้องเปลี่ยนตำแหน่งหรือช่วงการทดลองเพื่อให้ได้จุดที่เหมาะสมโดยพิจารณาทิศทางการเปลี่ยนตำแหน่งจากผลการทดลองเดิมไปในทิศทางที่มีจุดที่เหมาะสมอยู่ (Wu และ Hamada. 2000)



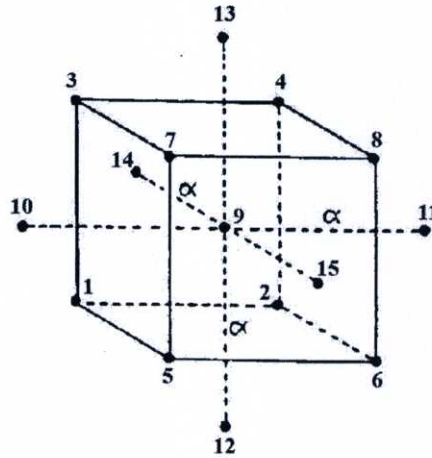
รูปที่ 2.8 แสดงพื้นผิวผลตอบสนองในรูปแบบของกราฟแบบโครงร่างพื้นผิว

(ก) กราฟ 3 มิติ (Response surface plot) (ข) กราฟเส้นโครงร่าง 2 มิติ (Contour plot)

ที่มา : Montgomery. 1991

2.9 การวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD)

แผนการทดลองที่เหมาะสมเพื่อหาสถานะในการผลิตด้วยวิธี RSM ที่มีตัวแปรอิสระหลายตัวแปรและให้หน่วยการทดลองที่ไม่มากเกินไป แต่ครอบคลุมจุดที่สำคัญ คือ การวางแผนการทดลองแบบ central composite design (CCD) ซึ่งประกอบด้วย 3 ส่วน คือ 2^k factorial in CRD หรือ RCBD อย่างสมบูรณ์หรือเพียงบางส่วน 2^k axial point หรือจุดที่อยู่บนแกน coordinate และจุดศูนย์กลาง เมื่อ k คือปัจจัยในการทดลอง และ m คือจำนวนการทดลองที่จุดศูนย์กลาง ดังนั้นหน่วยการทดลองทั้งหมด (n) ได้จาก $n = 2^k + 2k + m$ แสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.9 จุดของการออกแบบ 15 สิ่งทดลองในแบบ composite design ที่มี 3 ปัจจัย

ที่มา: ไพโรจน์ วิริยจารี (2544)

RSM สามารถประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวางเพื่อการตัดสินใจเลือกสถานะที่เหมาะสมหรือเลือกสถานะในการแปรรูปต่างๆ เช่น ในอุตสาหกรรมอาหาร การสังเคราะห์เอนไซม์ (Kim และคณะ. 2004 ; Bhaskar และคณะ. 2008) ดังนี้ คือ

จรัญ ประจันบาล และคณะ (2551) ได้ทำการศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ β -glucanase จากเชื้อรา *Aspergillus terreus* ASKU10 ในการหมักแบบอาหารแข็งที่ใช้ฟางข้าวเป็นวัสดุหมักด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง ปัจจัยที่ใช้ศึกษาได้แก่ ปริมาณความชื้นเริ่มต้น ความเข้มข้นของ corn steep liquors (CSL) และ KH_2PO_4 จากการศึกษาโดยใช้แบบจำลองอันดับสองพบว่าปริมาณที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 72 ความเข้มข้นของ CSL เท่ากับ 4.7 มิลลิลิตรต่อ 10 กรัมฟางข้าว และความเข้มข้นของ KH_2PO_4 เท่ากับ 0.79 กรัมต่อ 10 กรัมฟางข้าว จะให้ค่าทำนายกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 4,206 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และค่าทดลองของกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 4,570 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งสูงกว่าอาหารสูตรดั้งเดิม 3.08 เท่า

จันทร์จิรา อยู่คง (2546) ได้ทำการศึกษาเพื่อพัฒนาสูตรอาหารและปรับปรุงผลผลิตในกระบวนการหมักสปอร์ของ *B. subtilis* TISTR 001 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก ให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความเข้มข้นสูงทั้งปริมาณเซลล์และสปอร์ การทดลองใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้วิธีพื้นผิวการตอบสนองและออกแบบการทดลองแบบ CCD ศึกษาผลของปัจจัยที่เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ปัจจัย คือ กากน้ำตาล $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ พบว่าความเข้มข้นของปัจจัยเหล่านี้ที่เหมาะสมต่อการสร้างสปอร์ของ *B. subtilis* TISTR 001 คือ กากน้ำตาล (แสดงในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์) 19.85, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.35 และ $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.15 กรัมต่อลิตร ได้จำนวนสปอร์เท่ากับ 5.50×10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เนื่องจากสูตรอาหารดังกล่าวมีองค์ประกอบของกากน้ำตาลที่สูงทำให้เกิดฟองปริมาณมากในการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ดังนั้นจึงได้ทดลองหาสูตรอาหารที่ทำให้เกิดฟองน้อยลงและเหมาะสมต่อการสร้างสปอร์ ซึ่งพบว่าสูตรอาหารที่ให้จำนวนสปอร์สูงสุดคืออาหารที่มีองค์ประกอบของกากถั่วเหลือง 20 กรัมต่อลิตร กากน้ำตาล 3 กรัมต่อลิตร และ K_2HPO_4 0.5 กรัมต่อลิตร ได้จำนวนสปอร์เท่ากับ 1.30×10^9 สปอร์ต่อมล. ดังนั้นจึงได้ใช้สูตรอาหารนี้ในการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงในถังหมัก การเพาะเลี้ยงแบบกะได้ความเข้มข้นสปอร์ *B. subtilis* TISTR 001 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร เท่ากับ 1.78×10^9 สปอร์ต่อมล. ที่เวลา 48 ชั่วโมง และเท่ากับ 2.29×10^9 สปอร์ต่อมล. จากการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 1,500 ลิตร ที่เวลา 47 ชั่วโมง ผลการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะในถังหมักขนาด 75 ลิตร โดยใช้สูตรอาหารที่มีองค์ประกอบเดียวกับที่เพาะเลี้ยงแบบกะแต่เพิ่มความเข้มข้นกากน้ำตาลเป็น 5 กรัมต่อลิตร ได้จำนวนสปอร์เท่ากับ 5.73×10^9 สปอร์ต่อมล. ที่เวลา 48 ชั่วโมง

มณฑนพรพรข สงพิมพ์ และคณะ (2551) ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ pectate lyase จากเชื้อ *Paenibacillus polymyxa* สายพันธุ์ N10 ในอาหารเหลว โดยทำวางแผนการทดลองด้วยวิธี central composite design ซึ่งประกอบด้วยปัจจัยหลัก 3 ปัจจัย ได้แก่ ความเร็วรอบของการเขย่า (X_1 , 100-300 รอบต่อนาที) อุณหภูมิ (X_2 , 25-45 องศาเซลเซียส) และพีเอช (X_3 , 5.5-9.5) จากโมเดลพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและพีเอช มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญ โดยสมการกำลังสองที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) 0.9600 ($p < 0.001$) และจากการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ pectate lyase ที่สูงที่สุดที่ 84.5 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร ได้แก่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พีเอช 8 และความเร็วรอบของการเขย่า 200 รอบต่อนาที

Bocchini และคณะ (2002) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไซลานเนส (xylanase) จาก *Bacillus circulans* โดยปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ ความเข้มข้นของไซแลน (xylan), ค่าพีเอช และระยะเวลาที่เลี้ยง โดยออกแบบการทดลองแบบ 3^3 factorial design และวิเคราะห์ผลทางสถิติโดย Response Surface Methodology พบว่าค่าพีเอช ไม่ใช่ปัจจัยสำคัญในการผลิตไซลานเนส ส่วน

ความเข้มข้นของไซแลนและระยะเวลาในการเลี้ยงที่เหมาะสม คือ 5 กรัมต่อลิตร และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ให้ผลผลิตเอนไซม์ไซแลเนส 19.1 หน่วยต่อมิลลิลิตร

Ramnani และ Gupta (2004) ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์เคราติเนสโดย *Bacillus licheniformis* RGI การออกแบบการทดลองใช้ Plackett-Burman Design และ Face-Centred Central Composite Design วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธี Response Surface Methodology พบว่าจุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์เคราติเนสได้สูงสุดถึง 1295 ยูนิต์ต่อมิลลิกรัม น้ำหนักแห้ง โดยสูตรอาหารที่เหมาะสมคือ กลูโคสร้อยละ 1 เปปโตนร้อยละ 1 ฟอสเฟตร้อยละ 1 กลูตาไทโอนร้อยละ 0.05 ขนไก่ร้อยละ 0.5 และ หัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 2 ภายใต้สภาวะการเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และอัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที

Laura และคณะ (2008) ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ในกลุ่ม ลิกโนเซลลูเลส จากเชื้อรา *Trametes trogii* MYA 28-11 ในอาหารแข็ง โดยประยุกต์ใช้การออกแบบพื้นผิวทดสอบเพื่อศึกษา 3 ปัจจัยคือ ค่าพีเอช ความเข้มข้นของ CuSO_4 และเปปโตน โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้กระบวนการหมักมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสต่ำที่สุดในขณะที่ต้องการให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ ligninolytic สูงที่สุด ผลการทดลองพบว่าที่ค่าพีเอช 4.5 ความเข้มข้นของ เปปโตน 12.5 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของ CuSO_4 11 มิลลิโมลาร์ ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ laccase และ Mn-peroxidase สูงที่สุด เท่ากับ 901 และ 20 ยูนิต์ต่อกรัม ตามลำดับ

Shweta และคณะ (2009) ทำการศึกษาเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสูตรอาหารชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเจริญและการใช้โครเมียม (VI) ของเชื้อรา *Aspergillus lentulus* AML05 สำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในการกำจัดโลหะหนักจากโรงงานอุตสาหกรรม โดยใช้ RSM และวางแผนการทดลองแบบ central composite design (CCD) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีโครเมียม (VI) ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มก.ต่อลิตร พีเอช 6.5 ทำการศึกษาส่วนประกอบของอาหาร 5 ชนิดคือ กลูโคส, K_2HPO_4 , MgSO_4 , yeast extract และ NH_4NO_3 ผลการทดลองพบว่า yeast extract มีผลต่อการเจริญและการใช้โครเมียม (VI) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สูตรอาหารที่เหมาะสมคือ K_2HPO_4 0.5 , yeast extract 5 , MgSO_4 0.1, NH_4NO_3 0.5 และกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร จากกราฟพื้นที่ผิวการตอบสนองแสดงให้เห็นว่าจุดสูงสุดที่มีการใช้โครเมียม (VI) อย่างสมบูรณ์ (ร้อยละ 99.8) คือที่เวลา 120 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

Kagliwal และคณะ (2009) ค้นพบสูตรอาหารที่สามารถเพิ่มปริมาณการผลิต cephamycin C จากเชื้อ *Nocardia lactamdurans* NRRL 3802 ได้ในปริมาณที่มากขึ้นถึง 2 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารดั้งเดิม ในการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยทำการทดลองในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง ศึกษาตัวแปร 6 ตัว คือ ชนิดของวัตถุดิบ ปริมาณความชื้น ค่าพีเอชเริ่มต้น ปริมาณเชื้อ แหล่งไนโตรเจนและกรดอะมิโน โดยใช้วิธีพื้นที่ผิวการตอบสนอง พบว่าจุดที่ให้ค่าการตอบสนองมากที่สุดหรือสามารถผลิต cephamycin C ได้มากที่สุดนั่นเอง คือ เมื่อใช้วัตถุดิบเป็นแป้งถั่วเหลืองที่มี

ความชื้นร้อยละ 65 พีเอชเริ่มต้น 6.5 ปริมาณเชื้อ 10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร (2×10^8 CFUต่อกรัม น้ำหนักแห้ง) ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาการหมัก 4 วัน พบว่าปริมาณของ cephamycin C มีค่าเท่ากับ 15.75 ± 0.27 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะเดิมที่ใช้ในการผลิต สามารถผลิต cephamycin C ได้เพียง 8.37 ± 0.23 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

2.10 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

✓ น้อย เกษมสุขสกุล (2529) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยเชื้อราบนวัสดุของแข็ง โดยทำการแยกเชื้อราในอาหารที่มี welseth cellulose เป็นแหล่งคาร์บอน โดยการสังเกตแถบสีที่เกิดขึ้นและทำการคัดเลือกซ้ำโดยอาศัยความสามารถในการย่อยสลายกระดาษกรอง จากนั้นนำเชื้อราที่คัดเลือกได้มาทำการทดสอบการย่อยสลายในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งโดยเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เมื่อเลี้ยงเชื้อบนวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่าง ๆ เช่น ฟางข้าว ผักตบ ชวา เปลือกมันสำปะหลัง ชีกล้วย และแกลบ พบว่าเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อบนฟางข้าวที่มีขนาดยาว 2-4 เซนติเมตร และสามารถผลิต FPase และ CMCase เท่ากับ 16.353 และ 48.71 ยูนิตต่อกรัมวัสดุหมัก ตามลำดับ

จิตตเสน อรุณศรี (2529) ได้คัดแยกเชื้อราจากดิน มูลสัตว์ ไม้ผุ เศษใบไม้ และปุ๋ยหมัก จำนวน 100 ตัวอย่าง บนอาหารแข็งที่มีผงเซลลูโลส (cellulose powder) เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่ 45 องศาเซลเซียส พบเชื้อราทั้งสิ้น 41 ไอโซเลท เมื่อทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส โดยวิธี congo red test พบว่าไอโซเลท CM33B มีอัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสต่อโคโลนีสูงที่สุด ตรวจสอบพบว่าเป็น *Humicola nigrescans* จากนั้นนำไปทดสอบในอาหารเหลวเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่ แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน พีเอชและอุณหภูมิ พบว่า carboxymethyl cellulose และ potassium nitrate เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ได้สูงสุดที่พีเอช 5.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 วัน เมื่อนำไปทดสอบในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้แก่ ฟางข้าวป่น ชีกล้วย แกลบที่ผสมและไม่ผสมรำข้าว พบว่าเชื้อนี้สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีในฟางข้าวที่ไม่ผสมรำข้าว

✓ สมภพ สุวรรณรัฐ (2529) ได้ศึกษาสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ให้ได้ปริมาณสูงสุดจากเชื้อรา *Aspergillus fumigatus*, *Myceliophthora thermophila* และ *Trichoderma viride* ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็ง พบว่าปริมาณของอาหารที่ประกอบด้วย ฟางข้าว 8 กรัมและรำข้าว 2 กรัม เป็นอาหารที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *A. fumigates* เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สูตรอาหารที่เหมาะสมกับเชื้อ *M. Thermophila* คือฟางข้าว 2 กรัม รำข้าว 2 กรัม เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 45 องศา-

เซลเซียส และอาหารที่เหมาะสมกับ *T. viride* คือฟางข้าว 4 กรัม รำข้าว 6 กรัม เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด

นภา โล่ห์ทองและคณะ (2535) ได้ศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลส และไซแลน โดย *A. fumigatus Fresenius* รหัส 4-45-IF ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบ solid substrate ที่มีวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรม ได้แก่ ฟางข้าว ชานอ้อย ชังข้าวโพด กาบข้าวโพด และรำข้าวสาลี เป็นแหล่งธาตุคาร์บอน พบว่าฟางข้าวเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ ดังกล่าว ความชื้นเริ่มต้นของฟางข้าวเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการผลิตเอนไซม์ โดยเชื้อนี้ผลิตเอนไซม์ ทุกชนิด ได้ดีที่สุดที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 81 ส่วนการเติม NH_4NO_3 มีผลต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสและไซแลนแต่ละชนิดแตกต่างกัน กล่าวคือเพิ่มการสร้างเอนไซม์ β -xylanase, β -xylosidase และ FPase อย่างเด่นชัด แต่มีผลต่อการสร้าง β -glucosidase และ CMCase เพียงเล็กน้อย เชื้อที่ศึกษานี้สร้าง เอนไซม์ FPase, CMCase, β -glucosidase, β -xylanase และ β -xylosidase ได้ 19.4 24.6, 15.7, 54.0 และ 2.3 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง ตามลำดับ เมื่อเจริญในอาหารที่มีฟางข้าว 5 กรัม NH_4NO_3 0.2 กรัม และ yeast extract 0.001 กรัม ในระดับความชื้นเริ่มต้น ร้อยละ 81 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน การเติม sodium pentachlorophenate 2 มิลลิกรัม ลงในอาหารข้างต้นมีผลยับยั้งการสร้างสปอร์ การเจริญและการสร้างเอนไซม์ทุกชนิด ลดลงยกเว้นเอนไซม์ β -glucosidase

จุฑาธัญ คุรุชิตกานันท์ (2544) ได้คัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่เรียกร้อนจากตัวอย่างดินในจังหวัด เชียงใหม่ ได้ทั้งสิ้น 122 ไอโซเลท เมื่อทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสโดยวิธี congo red test บนอาหารแข็งที่มี CMC เป็นแหล่งคาร์บอน พบเชื้อที่เกิดวงใสรอบโคโลนีจำนวน 77 ไอโซเลท จากนั้นนำไปทดสอบในอาหารเหลว CMC เขย่าด้วยความเร็ว 140 รอบต่อนาที ที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน พบว่าไอโซเลท CMU4-4 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 0.066 หน่วยต่อมิลลิลิตรและค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ (specific activity) เท่ากับ 0.110 หน่วยต่อมิลลิกรัม โปรตีน จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ พบว่า ไอโซเลทนี้คือ *Bacillus subtilis*

Mendoza และ Josan (1986) ทำการคัดเลือกเชื้อราในขั้นต้นโดยมีเซลลูโลสผงเป็นแหล่ง คาร์บอน พบว่าสามารถคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้จำนวน 10 ไอโซเลทซึ่งอยู่ในสกุล *Trichoderma*, *Penicillium* และ *Aspergillus* จากนั้นนำมาทดสอบ ความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสในอาหารเหลวที่มีกระดาศกรอง ผ่าย CMC และ salicin เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน โดยมีเชื้อรา *Trichoderma reesi* QM 9414 เป็นเชื้อเปรียบเทียบ ผลปรากฏว่า *P. purpurogenum* ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ FPase, CMCase และ β -glucosidase สูงกว่าเชื้อ เปรียบเทียบ ในขณะที่ *A. terreus* ให้กิจกรรมของเอนไซม์ β -glucosidase สูงที่สุด

Gomes และคณะ (1989) ศึกษาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ จากเชื้อรา *Gliocladium virens* ผลการทดลองพบว่า แหล่งคาร์บอนที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดคือ ฟางข้าว ส่วนแหล่งไนโตรเจนคือ เปปโตน ซึ่งให้กิจกรรมของเอนไซม์ FPase β -glucosidase และ xylanase เท่ากับ 0.33 1.5 และ 2.85 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

Keskar (1992) ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากเชื้อรา *Penicillium janthinellum* (NCIM 1169) โดยทดลองเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกันและมีการเข้าให้อากาศ พบว่ารำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ FPase และ CMCase สูงที่สุด เท่ากับ 2.8 และ 40 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Okeke และ Paterson (1992) ศึกษาการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสของ *Streptomyces* sp. EC22 โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มี microcrystalline cellulose เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ CMCase และ Xylanase สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 72 และ ชั่วโมง ที่ 60 เท่ากับ 1.85 และ 2.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Prasertsan และ Oi (1992) ทำการเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์จากเชื้อรา *Myceliophthora thermophila* IFO 31843 และ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่แยกจากโรงงานน้ำมันปาล์ม โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีทะลายปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีการเข้า 130 รอบต่อนาที พบว่า *A. niger* ATCC 6275 สามารถผลิตเอนไซม์ CMCase, Xylanase และ β -glucosidase เท่ากับ 3.72, 7.70 และ 0.132 ยูนิตต่อมิลลิลิตรมากกว่า *M. thermophila* IFO 31843 ที่สร้างเอนไซม์เหล่านี้ได้เพียง 1.60, 3.92 และ 0.141 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

Umikalsom และคณะ (1997) คัดเลือกเชื้อรา *Chaetomium globosum* จากกองวัสดุเหลือทิ้งของผลปาล์มจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม แล้วนำมาศึกษาเปรียบเทียบการใช้แหล่งคาร์บอน 2 แหล่ง คือ เส้นใยปาล์มและกากปาล์ม ผลปรากฏว่าการใช้กากปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนให้ค่ากิจกรรมของ เอนไซม์สูงกว่าการใช้เส้นใยปาล์มและเมื่อนำกากปาล์มมาเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อใน อาหารเหลวเพื่อตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ FPase, CMCase และ β -glucosidase พบกิจกรรม ของเอนไซม์เท่ากับ 1.4, 30.2 และ 9.8 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

Yang และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจากเชื้อรา *Paecilomyces thermophila* J18 ในฟางข้าวด้วยสภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง พบว่าเชื้อราชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้ในระดับสูงคือ 18.580 ยูนิตต่อกรัมของวัสดุหมัก แต่ที่สภาวะดังกล่าวไม่พบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CMCase นอกจากนี้ยังรายงานค่าความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส คือร้อยละ 83 โดยใช้ระยะเวลาในการหมัก 8 วัน

Jianmin และคณะ (2008) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Aspergillus terreus* M11 ที่แยกได้จากกองปุ๋ยหมัก ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็ง ศึกษาแหล่งคาร์บอนแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้มี 6 ชนิด คือ รำข้าว ฟางข้าว เปลือกข้าวโพด หญ้าแฝก แกลบและชานอ้อย แหล่งไนโตรเจน Beef paste , Yeast extract, Peptone, Urea, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 และ NaNO_3 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ FPase, CMCCase และ β -glucosidase ผลการทดลองพบว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดมีค่าแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยที่เปลือกข้าวโพดให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ CMCCase, FPase และ β -glucosidase สูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 440, 198 และ 91 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ แหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดคือ Yeast extract ความเข้มข้นร้อยละ 1 น้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์โดยหาออกแบบการทดลองแบบ orthogonal ศึกษา 4 ปัจจัยคือ อุณหภูมิ (35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส), ความเข้มข้นของ Yeast extract (ร้อยละ 0.8, 1 และ 1.3) ความชื้นเริ่มต้น (ร้อยละ 70, 75 และ 80) และค่าพีเอชเริ่มต้น (2, 3 และ 4) ผลการทดลองพบว่า ชั่วโมงที่ 96 ของการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus terreus* M11 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ CMCCase, FPase และ β -glucosidase สูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 581, 243 และ 128 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เมื่อใช้เปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนในสภาพอาหารแข็ง ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 3 ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 0.8

บทที่ 3

การดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุ

3.1.1 วัสดุดิบ

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ กากกาแฟ ชังข้าวโพด กากปาล์ม ใบไม้แห้งและ ฟางข้าว ที่ผ่านการบดด้วยเครื่องบดให้มีขนาดไม่เกิน 2.0 มิลลิเมตร

3.1.2 จุลินทรีย์

ทำการคัดแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินบริเวณแหล่งต่างๆ ในจังหวัดกาญจนบุรี ได้แก่ บ่อน้ำพุร้อนหินคาง วัดวังวิเวการาม โป่งพุร้อน อุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ พุหลองปลิงและดิน บริเวณเขื่อนวชิราลงกรณ

3.2 สารเคมีและวัสดุที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

	บริษัทผู้ผลิต
อาหารเลี้ยงเชื้อรา ได้แก่ potato dextrose agar (PDA)	Scharlau
อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ nutrient agar (NA)	Scharlau
อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซิส ได้แก่ yeast malt agar (YM)	Scharlau
คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC)	sigma
แอลฟา เซลลูโลส (α -cellulose)	sigma
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	sigma
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	sigma
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	sigma
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	Ajex
สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS reagent)	sigma
คองโก เรด (congo red)	Fluka
เปปโตน (peptone)	Scharlau
สารสกัดจากมอลต์ (malt extract)	Scharlau
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	Scharlau

3.3 อุปกรณ์

	บริษัทผู้ผลิต
ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer) และกล้องจุลทรรศน์	Olympus optical
ตู้ถ่ายเชื้อ (incubator)	International Scientific Supply
ตู้อบเชื้อ (incubator) 45 องศาเซลเซียส	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ตู้อบลมร้อน (hot air oven) รุ่น 1375 FX	Sheldon Manufacturing.Inc
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) รุ่น Innova 4330	Scientific Promotion
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV 1601	Shimadzu
เครื่องหมุนเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) รุ่น Z 383K	Hermle Labortechnik
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น Tomy SS 325	Tomy-seiko
เครื่องวัดพีเอช (pH meter) รุ่น Cybascan 2000	United Instrument
เครื่องชั่งสาร 3 ตำแหน่ง รุ่น PG 803 และ 4 ตำแหน่ง	Mettler-Todedo
เครื่องเขย่าผสม (vortex mixer)	Brand
ไมโครปิเปต (micropipet)	Brand
เครื่องแก้วต่างๆ	Pyrex
หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) รุ่น Tomy SS 325	Tomy-seiko

3.4 วิธีการ

3.4.1 การเก็บตัวอย่าง

3.4.1.1 ทำการเก็บตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ ในจังหวัดกาญจนบุรี ได้แก่ บ่อน้ำพุร้อนหินดาด วัดวังวิเวการาม โป่งพุร้อน-อุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ พุทองปลิงและดินบริเวณเขื่อนวชิราลงกรณ โดยใช้เสียมมือขุดดินลึกประมาณ 10 เซนติเมตร ตัวอย่างละ 500 กรัม ใส่ถุงพลาสติกปิดผนึก กำหนดรหัสดังนี้

สถานที่	ใช้สัญลักษณ์
บ่อน้ำพุร้อนหินดาด	SA01
บริเวณหน้าผาดัดสันเขื่อนวชิราลงกรณ	SA02
ใต้ต้นสัก ทางขึ้นสันเขื่อนวชิราลงกรณ	SA03
ใต้ต้นไผ่บริเวณวัดวังวิเวการาม	SA04
ริมวัดวังวิเวการาม	SA05

สถานที่	ใช้สัญลักษณ์
โป่งพุร้อน-อุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ บริเวณน้ำไหล	SA06
โป่งพุร้อน-อุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ บริเวณน้ำขัง	SA07
โป่งพุร้อน-อุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ บริเวณดิน โป่ง 1	SA08
โป่งพุร้อน-อุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ บริเวณดิน โป่ง 2	SA09
โป่งพุร้อน-อุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ 1	SA10
โป่งพุร้อน-อุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ 2	SA11
โป่งพุร้อน-อุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ 3	SA12
ดินบริเวณรากต้นไม้ทิ้ง บริเวณทางเข้าอุทยาน	SA13
พุนองปลิง บริเวณเสื่อมโทรม	SA14
พุนองปลิง บริเวณน้ำไม่ขัง	SA15
พุนองปลิง บริเวณน้ำไหล ตอนปลายพุน	SA16
พุนองปลิง บริเวณริมลำธาร	SA17
พุนองปลิง ใต้ต้นไม้ริมลำธาร	SA18
พุนองปลิง บริเวณที่ใช้ปลูกข้าวไร่	SA19
บริเวณต้นไม้ทิ้งของชาวบ้านที่ใช้ในการปรับปรุงดิน	SA20

3.4.1.2 สำหรับตัวอย่างดินทำการตรวจวิเคราะห์อุณหภูมิบริเวณพื้นผิวของดิน (Globe. 2006) โดยใช้อุปกรณ์สำหรับวัดอุณหภูมิดิน (soil thermometer) บันทึกผลและหาค่าเฉลี่ย บันทึกตำแหน่ง สถานที่เก็บ วันที่เก็บและกำหนดหมายเลขรหัสตัวอย่างลงในแบบบันทึกข้อมูล เก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สำหรับวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

3.4.2 การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของดิน

3.4.2.1 สีดิน รายงานสีของดินตามระบบ Munsell (Globe. 2006)

3.4.2.2 ลักษณะเนื้อดินบันทึกรายละเอียดของลักษณะเนื้อดินที่เห็นด้วยตาเปล่าลงในแบบบันทึกข้อมูล

3.4.2.3 อุณหภูมิ ใช้เทอร์โมมิเตอร์สำหรับวัดอุณหภูมิดิน (soil thermometer) บันทึกผลขณะเก็บตัวอย่าง (Globe. 2006)

3.4.2.4 ค่าพีเอช (AOAC. 2000)

3.4.2.5 ปริมาณอินทรีย์วัตถุในดินใช้วิธีการเผา (Ignition loss method) (AOAC. 2000)

3.4.2.6 ความชื้น (AOAC. 2000)

3.4.3 การแยกเชื้อจุลินทรีย์ย่อยเซลลูโลสจากดิน

3.4.3.1 การแยกเชื้อราจากตัวอย่างดิน

1. นำตัวอย่างดินที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ออกมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องภายในตู้ปลอดเชื้อจนกระทั่งอุณหภูมิของตัวอย่างเท่ากับอุณหภูมิภายนอก ทำความสะอาดภายนอกด้วยแอลกอฮอล์ร้อยละ 70 (ดัดแปลงจาก Globe, 2006)

2. ทำการเจือจางตัวอย่างดินด้วยเทคนิค serial dilution ในสารละลายซาลิน (saline) ปลอดเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 0.85 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (% w/v) ให้ได้ความเข้มข้น $10^{-1} - 10^{-6}$ ตั้งทิ้งไว้จนอนุภาคดินเริ่มตกตะกอน ประมาณ 2 – 3 นาที (Eggins และ Pugh, 1962)

3. ทำการเปิดตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-4} , 10^{-5} และ 10^{-6} มา 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารแข็งแอลฟาเซลลูโลส (ภาคผนวก ก) ใช้แท่งแก้ว (spreader) จุ่มแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 เผาไฟ นำไปเกลี่ยสารละลายจุลินทรีย์ให้กระจายทั่วอาหาร (spread plate) โดยทำซ้ำจำนวน 3 ซ้ำ ต่อการเจือจางแต่ละความเข้มข้น

4. บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สังเกตและเก็บรวบรวมเชื้อราที่เจริญ และสามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ โดยสังเกตจากวงใส (clear zone) รอบ ๆ โคลินี่

5. เชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้นำมาเพาะเลี้ยงบน Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แล้วเก็บบนอาหารวุ้นเอียงเพื่อเป็นเชื้อใช้งาน (stock culture) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการถ่ายเชื้อ (subculture) ทุก ๆ เดือนหรือตามปริมาณการใช้งาน ซึ่งจะมีอายุการเก็บได้ประมาณ 6 เดือน และทำการเก็บสำรองเชื้อด้วยวิธีการแช่เยือกแข็ง (freezing and cryogenic storage) โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารวุ้นเอียงเมื่อเชื้อเจริญและสร้างสปอร์แล้วเติมสารละลายกลีเซอรอล (glycerol) ปลอดเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตรต่อปริมาตร ลงไปปิดฝาให้สนิทแล้วจึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อป้องกันการแปรผันทางพันธุกรรม

3.4.3.2 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน

1. วิธีทำเช่นเดียวกันกับการแยกเชื้อรา ข้อ 1-4

2. ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค cross streak จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้มาเพาะเลี้ยงบน nutrient agar (NA) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เก็บบนอาหารวุ้นเอียงเพื่อเป็นเชื้อสำหรับการใช้งานที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการเก็บสำรองเชื้อด้วยวิธีการแช่เยือกแข็ง โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว NB ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในสถานะนิ่ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายเซลล์มาผสมกับสารละลายกลีเซอรอล ปลอดเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตรต่อปริมาตร ปิดฝาให้สนิทแล้วจึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

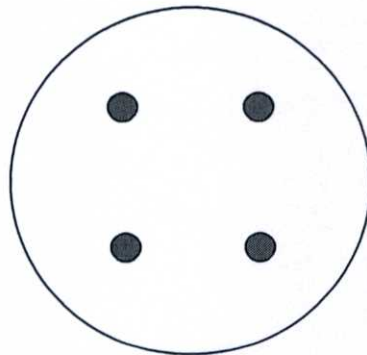
3.4.3.3 การแยกเชื้อแอสกีโนมัยซิสจากตัวอย่างดิน

1. วิธีทำเช่นเดียวกันกับการแยกเชื้อรา ข้อ 1-4
2. เชื้อแอสกีโนมัยซิสที่แยกได้นำมาเพาะเลี้ยงบน yeast malt extract agar (YM) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แล้วเก็บบนอาหารวุ้นเหียงเพื่อเป็นเชื้อใช้งานที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการเก็บสำรองเชื้อด้วยวิธีการแช่เยือกแข็งโดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารวุ้นเหียงเมื่อเชื้อเจริญและสร้างสปอร์แล้วเติมกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 20 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปิดฝาให้สนิทแล้วจึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4.4 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยเซลลูโลสในสภาพอาหารแข็ง

3.4.4.1 เชื้อรา แบคทีเรียและแอสกีโนมัยซิสแต่ละไอโซเลทที่เก็บไว้ในอาหารวุ้นเหียงนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA, NA และ YM ตามลำดับ

3.4.4.2 สำหรับเชื้อราและแอสกีโนมัยซิสใช้คอร์กบอยเลอร์ (cork borer) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะโคโลนีเชื้อที่เลี้ยงบนอาหารแข็งมาวางตรงจุดกึ่งกลางอาหาร carboxymethyl cellulose agar (CMC) (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน สำหรับแบคทีเรียใช้วิธี agar spot (Spelhaug และ Harlander, 1989) โดยเตรียมเชื้อเริ่มต้นในอาหารเหลวนิวตริยนต์ (NB) (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นของเซลล์โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายเซลล์ (cell suspension) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารแข็ง CMC งานอาหารละ 4 จุด (รูปที่ 3.1) ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งสารละลายเซลล์แห้ง นำไปบ่มที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลองไอโซเลทละ 3 ซ้ำ



รูปที่ 3.1 ตำแหน่งการหยดสารละลายเซลล์แบคทีเรีย

ด้วยวิธี agar spot บนอาหารแข็ง CMC

3.4.4.3 ทำการทดสอบความสามารถในการย่อยเซลลูโลสด้วยการทดสอบการละลาย congo red เข้มข้นร้อยละ 0.1 (ภาคผนวก ข) ให้ท่วมเชื้อเป็นเวลา 15 นาที เททิ้งแล้วเททับด้วย สารละลาย NaCl เข้มข้น 1 โมลาร์ จะปรากฏวงใสที่ไม่ติดสีแดงของ congo red ซึ่งเกิดจากการย่อย สลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลส วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสและเส้นผ่านศูนย์กลาง โคลินีของ ไอโซเลท

3.4.4.4 คำนวณหาอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสต่อขนาดโคลินี

3.4.4.5 ทำการคัดเลือกไอโซเลทที่มีค่าอัตราส่วนของวงใสต่อขนาดโคลินีสูงกว่า ตำแหน่งเปอร์เซ็นต์ไทด์ที่ 60 ขึ้นไป นำมาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในขั้น ต่อไป

3.4.5 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยเซลลูโลสในสภาวะการเลี้ยงเชื้อ แบบอาหารเหลว

3.4.5.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น (inoculum)

เชื้อรา

นำเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อที่ 3.4.4 เลี้ยงบนอาหารวุ้นเยียง (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 วัน เมื่อครบเวลาเติมสารละลาย Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่ นำเชื้อแล้ว ใช้ลูปชุบสปอร์ออกจากผิวหน้าอาหาร เขย่าให้สปอร์กระจายสม่ำเสมอ นับจำนวน สปอร์ด้วยเครื่องนับสปอร์ (Heamacytometer) ปรับปริมาณสปอร์เป็น 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

แบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อที่ 3.4.4 มา cross streak บนอาหาร NA บ่มที่ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว จากนั้นเจือเชื้อมาประมาณ 1 - 2 โคลินี ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่ม บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่องสเปกโตร โฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5

แอกติโนมัยซิส

นำแอกติโนมัยซิสที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4.4 เลี้ยงบนอาหารวุ้นเยียง (YM) บ่มที่ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 วัน เมื่อครบเวลาเติมสารละลาย Tween 80 ความเข้มข้น ร้อยละ 0.1 ที่นำเชื้อแล้ว ใช้ลูปชุบสปอร์ออกจากผิวหน้าอาหาร เขย่าให้สปอร์กระจายสม่ำเสมอ นับ จำนวนสปอร์ด้วยเครื่องนับสปอร์ ปรับปริมาณสปอร์เป็น 1×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (Angel และ คณะ. 2008)

3.4.5.2 ทดสอบความสามารถในการย่อยเซลลูโลสในอาหารเหลว

3.4.5.2.1 เตรียมอาหารเหลวแอลฟาเซลลูโลส (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร

3.4.5.2.2 เติมเชื้อเริ่มต้นที่คัดเลือกจากข้อ 3.4.4 ลงไป ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ (ข้อ 3.4.5.1) ลงในอาหารเหลวแอลฟาเซลลูโลส บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.4.5.2.3 เก็บตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากพลาสติกในวันที่ 2, 3, 5 และ 7 ของการเลี้ยงเชื้อมาแยกเซลล์ โดยนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บเฉพาะส่วนใส (crude enzyme) ใส่ในหลอดเพื่อทำการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ตามวิธีการในข้อ 3.4.7.1

3.4.5.2.4 ทำการคัดเลือกไอโซเลทโดยพิจารณาจากค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส

3.4.6 ศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

3.4.6.1 การเตรียมตัวอย่าง

3.4.6.1.1 นำวัสดุต่อไปนี้ได้แก่ กากกาแฟ ชั่งข้าวโพด เศษใบไม้แห้ง กากปาล์มและฟางข้าว ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 1 คืน และทำการบดให้มีขนาดประมาณ 2.0 มิลลิเมตร

3.4.6.1.2 ชั่งตัวอย่างที่บดแล้วมาตัวอย่างละ 10 กรัม ใส่ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ทรีทเมนต์ละ 4 ซ้ำ

3.4.6.1.3 ปรับความชื้นเริ่มต้นด้วยสารละลายเกลือแร่ (ภาคผนวก ก) ลงไปพลาสติกละ 10 มิลลิลิตร

3.4.6.1.4 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.4.6.1.5 รอให้อาหารเย็น แล้วเติมเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4.5 ลงไป การเตรียมเชื้อเริ่มต้นทำเช่นเดียวกับข้อ 3.4.5.1 เขย่าให้เชื้อกระจายไม่จับตัวเป็นก้อน

3.4.6.1.6 บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มควบคุมความชื้น โดยปรับความชื้นสัมพัทธ์ภายในตู้เป็นร้อยละ 60 เพื่อลดการระเหยของน้ำ เป็นเวลา 7 วัน

3.4.6.2 การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์

เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาในการหมัก (ครบ 7 วัน) ทำการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและไซทานเนส ดังนี้

3.4.6.2.1 เติมสารละลายซิติเรตบัพเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ในตู้เย็นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เขย่าเป็นครั้งคราว

3.4.6.2.2 ทำการกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเก็บส่วนใสไปทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสตามวิธีของ Mandels และ Sternberg. (1976) และกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสตามวิธีของ Kitprechanvanich และคณะ (1984) ในข้อ 3.4.7

3.4.6.2.3 รายงานผลเป็นยูนิตต่อกรัมของวัสดุหมัก (ภาคผนวก ก)

3.4.7 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

3.4.7.1 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

นำส่วนใสที่ได้จากข้อ 3.4.6 ที่เจือจางอย่างเหมาะสมปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย CMC เข้มข้นร้อยละ 1 ในซิติเรตบัพเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลาย Dinitrosalicylic acid (DNS) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงไป นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร หลอดควบคุมให้ใช้บัพเฟอร์แทนเอนไซม์ วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น โดยเทียบค่ากลูโคสจากกราฟมาตรฐานและคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (ภาคผนวก ก)

3.4.7.2 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส

นำส่วนใสที่ได้จากข้อ 3.4.6 ที่เจือจางอย่างเหมาะสมปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายไซแลน (xylan) เข้มข้นร้อยละ 1 ในซิติเรตบัพเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 3 มิลลิลิตรลงไป นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร หลอดควบคุมให้ใช้บัพเฟอร์แทนเอนไซม์ วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น โดยเทียบกับค่าความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสจากกราฟมาตรฐานและคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนส (ภาคผนวก ก)

3.4.8 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตหัวเชื้อ

3.4.8.1 แบคทีเรีย

ทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลว โดยใช้ NB เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียที่คัดเลือก ออกแบบการทดลองโดยใช้พื้นที่ผิวการตอบสนอง (Response surface methodology :

RSM) โดยมีตัวแปร (variable) ที่เลือกศึกษาและมีอิทธิพลต่อการผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียจำนวน 3 ตัวแปรคือ ค่าพีเอชเริ่มต้น อุณหภูมิและอัตราการเขย่า (ตารางที่ 3.1) วางแผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD) ตามวิธีการของ Ahmad และคณะ (2005) Mu และคณะ (2006) และ Shu และคณะ (2006) ซึ่งสามารถออกแบบการทดลองได้ทั้งหมด 20 การทดลอง (ตารางที่ 3.2) ประกอบด้วย จุดกึ่งกลาง (center point) จำนวน 6 จุด จุดขอบ (axial point) จำนวน 6 จุด และ factorial point จำนวน 8 จุด

จากแผนการทดลองแบบ CCD สามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของตัวแปรอิสระที่ศึกษา (dependent variable) คือ ค่าพีเอชเริ่มต้น อุณหภูมิและอัตราการเขย่าที่มีผลต่อปริมาณเซลล์ ดังสมการ

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2$$

โดยที่ Y คือ ปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่สูงสุดโดยวัดจากค่าความขุ่น X_1 คือ ค่าพีเอชเริ่มต้น X_2 คือ อุณหภูมิ และ X_3 คืออัตราการเขย่า ในขณะที่ β คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficients)

ตารางที่ 3.1 ตัวแปรอิสระและระดับของตัวแปรอิสระทั้ง 5 ระดับ ตามแผนการทดลองแบบ CCD

ตัวแปรอิสระ	สัญลักษณ์	รหัส (code factor level)				
		- 1.68	-1	0	+1	+ 1.68
ค่าพีเอชเริ่มต้น	X_1	1.95	4.0	7.0	10.0	12.05
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	X_2	23.5	29.0	37.0	45.0	50.4
อัตราการเขย่า (รอบต่อนาที)	X_3	116.0	100.0	200.0	300.0	368

หมายเหตุ ระยะเวลาในการบ่มเท่ากันคือ 24 ชั่วโมง

X_1 แทน ค่าพีเอชเริ่มต้น

X_2 แทน อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)

X_3 แทน อัตราการเขย่า (รอบต่อนาที)

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์แล้ว ทำการศึกษา
ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์สูงที่สุด โดยเก็บตัวอย่างทุก ๆ 3 ชั่วโมง
วัดความขุ่น (optical density) ของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโต-
มิเตอร์

ตารางที่ 3.2 สภาวะที่ใช้ในการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย BA118
จากแผนการทดลองแบบ CCD

สภาวะ (Treatment)	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1
4	-1	+1	+1
5	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1
7	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1
9	-1.68	0	0
10	+1.68	0	0
11	0	-1.68	0
12	0	+1.68	0
13	0	0	-1.68
14	0	0	+1.68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0

3.4.8.2 เชื้อรา

ทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็ง โดยใช้ข้าวฟ่างเป็นตัวยัดเกาะ โดยเริ่มจากการนำเมล็ดข้าวฟ่างมาล้างน้ำเพื่อกำจัดสิ่งสกปรกที่ปนเปื้อนออกไป จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 1 คืน เก็บรักษาโดยใส่ในกล่องพลาสติกกันความชื้น ในการทดลองใช้ข้าวฟ่าง 10 กรัม ใส่ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นจะทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราไอโซเลทที่ถูกคัดเลือกโดยใช้การทดลองแบบแฟกทอเรียล 4 x 4 ด้วยแผนการทดลองแบบสุ่มตลอดโดยสมบูรณ์ Complete randomized design, CRD) ศึกษา 2 ปัจจัยคือ อุณหภูมิ (30, 37, 45 และ 50 องศาเซลเซียส) และความชื้นเริ่มต้น (50, 60, 80 และ 100) ทำการทดลองทริทเมนต์ละ 3 ซ้ำ เป็นเวลา 5 วัน บันทึกการเจริญของเชื้อโดยเชื้อราโดยใช้วิธีการนับปริมาณสปอร์ด้วยเครื่องนับสปอร์ รายงานผลเป็น log สปอร์ต่อกรัมเมล็ดข้าวฟ่าง จากนั้นคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญโดยเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan' New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เวอร์ชัน 11.5

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญแล้ว ทำการศึกษาระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์สูงที่สุด โดยเก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 วัน เป็นเวลา 14 วัน ทำการตรวจนับจำนวนสปอร์และรายงานผลเป็น log สปอร์ต่อกรัมเมล็ดข้าวฟ่าง

3.4.8.3 แอคติโนมัยซิส

ทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็งโดยใช้ข้าวฟ่างเป็นตัวยัดเกาะเช่นเดียวกับเชื้อราในข้อ 3.4.8.1 จากนั้นจะทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแอคติโนมัยซิสที่คัดเลือกโดยใช้การทดลองแบบแฟกทอเรียล 3 x 5 ด้วยแผนการทดลองแบบสุ่มตลอดโดยสมบูรณ์ (Complete randomized design, CRD) ศึกษา 2 ปัจจัยคือ อุณหภูมิ (30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส) และ ความชื้นเริ่มต้น (40, 50, 60, 80 และ 100) ทำการทดลองทริทเมนต์ละ 3 ซ้ำ เป็นเวลา 5 วัน บันทึกการเจริญโดยใช้วิธี serial dilution plating บนอาหารแข็ง YM บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 - 2 วัน นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหาร โดยเลือกนับจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30 – 300 โคโลนี รายงานผลเป็น CFU ต่อกรัมเมล็ดข้าวฟ่าง (Lee และ Rho. 1993) จากนั้นคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมโดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan' New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เวอร์ชัน 11.5

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญแล้ว ทำการศึกษาระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์สูงที่สุด โดยเก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 วัน เป็นเวลา 14 วัน ทำการตรวจนับจำนวนโคโลนีและรายงานผลเป็น log สปอร์ต่อกรัมเมล็ดข้าวฟ่าง

3.4.9 การจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ในระดับจิ้นัส

3.4.9.1 แบคทีเรีย

นำไอโซเลตที่ถูกคัดเลือกลงมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยดูลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารและย้อมสีเอนโดสปอร์ (spore stain) นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า เพื่อดูลักษณะของเซลล์ (vegetative cell) และสปอร์ (spore) ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ (ภาคผนวก ค) การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย โดยยึดตามหลักการจัดจากหนังสือ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Krieg และคณะ. 1984)

3.4.9.2 เชื้อรา

ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราโดยใช้ slide culture technique คือ เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเพาะเชื้อ ตัดชิ้นวุ้นประมาณ 3 x 3 มิลลิเมตร มาวางบนสไลด์ ใช้เข็ม (needle) เขี่ยเชื้อรามาวางบนอาหารแบบ point inoculation ด้านบนและด้านข้างชิ้นวุ้น ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ปราศจากเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งเส้นใยของเชื้อราเจริญถึงขอบกระจกปิดสไลด์ จึงนำมาทำ wet mount ด้วยน้ำยา lactophenol นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า เพื่อศึกษาลักษณะของเส้นใย สปอร์และโครงสร้างอื่น ๆ บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้วนำไปเปรียบเทียบกับลักษณะการจำแนกเชื้อราในระดับจิ้นัส (Gilman. 1971)

3.4.9.3 แอคติโนมัยซิส

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซิส (morphological and cultural characteristics) โดยทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง YM โดยวิธี cross streak (Shirling และ Gottlieb . 1966) ตรวจสอบผลโดยดูจากการเจริญและสีของเส้นใยที่เจริญอยู่บนอาหาร (aerial mycelium) สีของเส้นใยที่เจริญอยู่ในวุ้น (substrate mycelium) และสีของรงควัตถุที่แพร่ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ (soluble pigment) ตรวจสอบลักษณะของเส้นใยและการสร้างสปอร์ด้วยเทคนิค Simple inclined coverslip (Williams และ Cross.1971) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ กำลังขยาย 400 - 1000 เท่า ทดสอบคุณสมบัติทางเคมีตามวิธีของ Ruan (1994) และ Lechevalier และ Lechevalier (1980) ซึ่งประกอบไปด้วย การวิเคราะห์ชนิดของกรดไดอะมิโนไพมิลิก (Diamino pimelic acid, DAP) ในองค์ประกอบของผนังเซลล์และวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลจากการย่อยสลายเซลล์ทั้งหมด (ภาคผนวก ค) นำผลการวิเคราะห์มาจัดจำแนกแอคติโนมัยซิสในระดับจิ้นัสตามวิธีของ William และคณะ (1989)

3.4.10 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

3.4.10.1 การทดลองหัวข้อที่ 3.4.4, 3.4.5 และ 3.4.6 วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) วิเคราะห์ความแปรปรวนของผลการทดลองด้วย Analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลโดยใช้วิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS เวอร์ชัน 11.5

3.4.10.2 การทดลองหัวข้อที่ 3.4.8.1 วางแผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD) ที่มี 3 ตัวแปร ศึกษาความสัมพันธ์ของแต่ละตัวแปรโดยใช้วิธีพื้นที่ผิวการตอบสนอง (Response surface methodology : RSM) ด้วยโปรแกรม Statistica เวอร์ชัน 7.0

3.4.10.3 การทดลองหัวข้อที่ 3.4.8.2 และ 3.4.8.3 ออกแบบการทดลองแบบ แฟคทอเรียล ศึกษา 2 ปัจจัย ด้วยแผนการทดลองแบบสุ่มตลอดโดยสมบูรณ์ วิเคราะห์ความแปรปรวนของผลการทดลองด้วย Analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลโดยใช้วิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS เวอร์ชัน 11.5

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

4.1 ผลการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของดิน

จากผลการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของดิน ได้แก่ สีดิน อุณหภูมิ พีเอช ความชื้นและปริมาณอินทรีย์วัตถุ พบว่าสีของดินสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือสีน้ำตาลถึงสีน้ำตาลปนเทาเข้มมาก (10YR2/2 - 10YR5/4) และสีเหลืองปนแดงถึงสีแดง (7.5YR - 5YR) อุณหภูมิของดินอยู่ในช่วง 20 - 31 องศาเซลเซียส มีเพียงตัวอย่างดินรหัส SA01 ที่มีอุณหภูมิสูงถึง 40 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นดินที่อยู่ใกล้บ่อน้ำพุร้อน ค่าพีเอชของตัวอย่างดินอยู่ในช่วง 5.4 - 8.9 โดยตัวอย่างดินรหัส SA05 มีค่าพีเอชต่ำที่สุดเท่ากับ 5.4 และตัวอย่างดินรหัส SA02 มีค่าพีเอชสูงที่สุดเท่ากับ 8.9 ร้อยละความชื้นของดินแตกต่างกันตามแหล่งที่เก็บจากตารางที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าตัวอย่างดินรหัส SA18 ที่เก็บจากพุหนองปลิงมีร้อยละความชื้นสูงที่สุดคือร้อยละ 86.50 ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณอินทรีย์วัตถุที่สูงถึงร้อยละ 60.68 เนื่องจากบริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่างมีการทับถมของเศษใบไม้เป็นจำนวนมากและพื้นที่โดยรอบมีต้นไม้ใหญ่ปกคลุม แต่ในขณะที่ตัวอย่างดินรหัส SA17 ซึ่งเก็บมาจากพุหนองปลิงเช่นกันแต่พบว่ามีปริมาณอินทรีย์วัตถุต่ำเพียงร้อยละ 6.38 ทั้งนี้อาจมีผลเนื่องมาจากบริเวณที่เก็บตัวอย่างดินมีลักษณะทางกายภาพแตกต่างกันเช่นความลาดเอียงของพื้นที่ ทำให้อินทรีย์วัตถุถูกน้ำพัดพาไปบริเวณตอนปลายพุ (SA16) เป็นบริเวณที่เศษซากพืชจะถูกพัดมาทับถมบริเวณนี้เป็นส่วนใหญ่ ลักษณะของดินมีเศษใบไม้เน่าเปื่อยบนอยู่มากส่งผลให้ค่าอินทรีย์วัตถุในดินสูงที่สุดคือร้อยละ 79.48

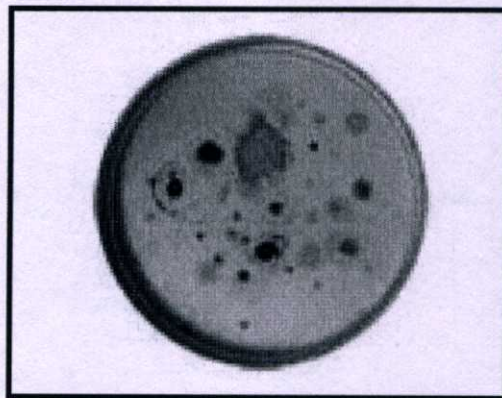
4.2 ผลการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ย่อยเซลลูโลสได้จากดิน

4.2.1 การคัดแยกขั้นที่ 1 (Primary screening)

ผลการคัดแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินบริเวณต่าง ๆ ในจังหวัดกาญจนบุรีทั้ง 6 แห่ง ได้แก่ บ่อน้ำพุร้อนหินดาด วัดวังวิเวการาม โป่งพุร้อน อุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ พุหนองปลิงและดินบริเวณเขื่อนวชิราลงกรณ รวมตัวอย่างดินทั้งสิ้น 20 ตัวอย่าง พบจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในอาหารทดสอบที่มีแอลฟาเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนมีลักษณะแตกต่างกัน ดังรูปที่ 4.1 รวมทั้งสิ้น 198 ไอโซเลท จากการศึกษาลักษณะโคโลนีและลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สามารถจำแนกเบื้องต้นได้เป็น เชื้อรา แบคทีเรียและแอกติโนมัยซิส จำนวน 14, 150 และ 34 สายพันธุ์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) ซึ่งแบคทีเรียมีจำนวนมากที่สุดเนื่องจากมีความสามารถในการ

เจริญเติบโตได้เร็วกว่าเชื้อราและแอกติโนมัยซิส นอกจากนี้แบคทีเรียจัดว่าเป็นกลุ่มผู้ย่อยสลายที่มีความสำคัญและมีบทบาทต่อการย่อยอินทรีย์วัตถุที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อน (Waldrop และ Firestone, 2004) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของวิสาข์ ลิปัญญา (2545) ที่คัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากดินและพบแบคทีเรียมากที่สุดเช่นกัน

ความหลากหลายของจำนวนจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันนี้เนื่องมาจากองค์ประกอบทางกายภาพของตัวอย่างดินในแต่ละพื้นที่ ปริมาณสารอินทรีย์และความอุดมสมบูรณ์ของดิน ค่าพีเอช อุณหภูมิและความชื้น จากตารางที่ 4.2 แสดงจำนวนไอโซเลทแต่ละชนิดที่พบในตัวอย่างดินทั้ง 20 ตัวอย่างพบว่าตัวอย่างดินรหัส SA01 SA02 SA03 SA04 SA05 SA09 และSA13 ไม่พบเชื้อแอกติโนมัยซิส จากรายงานของ Williams และคณะ (1989) พบแอกติโนมัยซิสสกุล *Streptomyces* หนาแน่นในดินที่มีปริมาณสารอินทรีย์มากและมีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 6.5– 8.0 อีกทั้งแอกติโนมัยซิสส่วนใหญ่ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสเป็นพวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 30 – 37 องศาเซลเซียส (mesophile) จึงอาจเป็นสาเหตุให้ไม่พบเชื้อแอกติโนมัยซิสในตัวอย่างดินดังกล่าว



รูปที่ 4.1 จุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารแข็งแอลฟาเซลลูโลส เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

4.2.2 การคัดแยกขั้นที่ 2 (Secondary screening)

4.2.2.1 เชื้อรา

นำไอโซเลททั้งหมดที่แยกได้จากข้อ 4.2.1 มาคัดแยกต่อในขั้นที่ 2 เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่จุลินทรีย์พวกทนอุณหภูมิสูง (thermotolerant) และชอบอุณหภูมิสูง (thermophile) สามารถเจริญและสร้างเอนไซม์ได้ เนื่องจากอุณหภูมิภายในกองปุ๋ยหมักจะเพิ่มสูงขึ้น

ตารางที่ 4.1 แสดงข้อมูลตัวอย่างดินที่เก็บจากจังหวัดกาญจนบุรี

ลำดับ	สถานที่เก็บตัวอย่างดิน	รหัส	อุณหภูมิ (°C)	สีดิน	ค่าพีเอช	ร้อยละ ความชื้น	ร้อยละ อินทรีย์วัตถุ
1	บ่อน้ำพุร้อนหินดาต	SA01	40	7.5YR2.5/1	7.3	37.84	4.71
2	บริเวณหน้าผาดัดสันเขื่อนวชิราลงกรณ	SA02	24	7.5YR4/3	8.9	26.36	29.33
3	ใต้ต้นสัก ทางขึ้นสันเขื่อนวชิราลงกรณ	SA03	26	7.5YR3/4	5.53	28.67	20.92
4	ใต้ต้นสัก สวนสาธารณะหน้าเขื่อนวชิราลงกรณ	SA04	23	7.5YR3/4	7.13	17.92	18.70
5	ดินบริเวณราก ฝายในวัดวังวิเวการาม	SA05	26	5YR5/4	5.4	5.68	14.26
6	โป่งพุร้อน-อุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ บริเวณน้ำไหล	SA06	29	10YR2/2	8.14	54.37	16.78
7	โป่งพุร้อน-อุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ บริเวณน้ำขัง	SA07	29	10YR4/2	7.6	72.67	33.07
8	โป่งพุร้อน-อุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ บริเวณดินโป่ง 1	SA08	31	10YR2/2	7.33	40.78	11.12
9	โป่งพุร้อน-อุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ บริเวณดินโป่ง 2	SA09	29	10YR3/6	7.6	48.88	24.06
10	โป่งพุร้อน-อุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ 3	SA10	23	10YR3/4	6.7	35.61	8.19
11	โป่งพุร้อน-อุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ 1	SA11	26	10YR2/2	6.2	17.37	9.30
12	โป่งพุร้อน-อุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ 2	SA12	24	10YR2/2	6.39	23.42	15.04
13	ดินบริเวณรากต้นปอเทือง ทางเข้าอุทยาน	SA13	28	10YR5/4	5.84	6.24	7.70
14	พุนหนองบึง บริเวณเสื่อมโทรม	SA14	22	7.5YR4/4	7.34	55.84	10.55
15	พุนหนองบึง บริเวณน้ำไม่ขัง	SA15	20	7.5YR2.5/2	7.54	80.59	52.55
16	พุนหนองบึง บริเวณน้ำไหล ตอนปลายพุน	SA16	20	7.5YR2.5/1	8.05	82.63	79.48
17	พุนหนองบึง บริเวณริมลำธาร	SA17	20	7.5YR3/4	7.89	49.48	6.38
18	พุนหนองบึง ดินรอบโคนต้นไม้ใหญ่	SA18	22	7.5YR2.5/2	6.91	86.50	60.68
19	พุนหนองบึง บริเวณที่ใช้ปลูกข้าวไร่	SA19	22	7.5YR2.5/3	7.46	36.78	26.07
20	บริเวณต้นปอเทืองที่ชาวบ้านปลูกเพื่อปรับปรุงดิน	SA20	24	7.5YR4/6	7.28	21.01	4.71

อย่างรวดเร็วถึง 50-60 องศาเซลเซียส ในช่วง 2-4 วันแรก (Benito และคณะ. 2003) ดังนั้นจึงต้องคัดแยกเชื้อที่อุณหภูมิดังกล่าวเพื่อให้การย่อยสลายเสร็จสมบูรณ์ในเวลาอันรวดเร็ว สำหรับการคัดแยกในขั้นตอนนี้จะทำการคัดเลือกโดยพิจารณาจากความสามารถในการย่อยสลายอาหารเซลลูโลสบนอาหารแข็ง CMC จากนั้นทดสอบด้วยวิธี congo red test ปรากฏผลการเกิดวงใส (clear zone) รอบโคโลนีของเชื้อ พิจารณาประสิทธิภาพของการย่อยโดยดูจากค่าอัตราส่วนวงใสต่อขนาดโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลท จากการทดสอบพบว่าเชื้อราจำนวน 14 ไอโซเลท เกิดวงใสรอบโคโลนีและมีค่าเฉลี่ยอัตราส่วนวงใสต่อโคโลนีอยู่ในช่วง 1.00 – 10.27 (ตารางที่ 4.3) จากนั้นคัดเลือกเชื้อราไอโซเลทที่ให้อัตราส่วนวงใสต่อโคโลนีที่มีค่าตั้งแต่ตำแหน่งเปอร์เซนไทล์ที่ 60 ขึ้นไปมาทดสอบความสามารถในการย่อยเซลลูโลสในขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.2 จำนวนจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณต่างๆ ในจังหวัดกาญจนบุรี บนอาหารแข็งแอลฟาเซลลูโลส บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

รหัส	จำนวนไอโซเลท		
	รา	แบคทีเรีย	แอกติโนมัยซิส
SA01	0	9	0
SA02	0	5	0
SA03	0	0	0
SA04	1	0	0
SA05	1	1	2
SA06	0	6	4
SA07	0	11	2
SA08	0	14	1
SA09	0	15	0
SA10	2	9	1
SA11	1	5	2
SA12	1	6	7
SA13	1	3	0
SA14	1	22	1
SA15	0	6	3
SA16	0	20	5
SA17	2	1	0
SA18	1	9	2
SA19	0	8	1
SA20	3	0	3
รวม	14	150	34

จากการใช้โปรแกรมทางสถิติคำนวณทำให้ทราบว่าตำแหน่งเปอร์เซนไทล์ที่ 60 ของค่าเฉลี่ยอัตราส่วนวงใสต่อโคโลนิของเชื้อรามีค่าเท่ากับ 2.63 (ตารางที่ 4.4) แต่เนื่องจาก FA39 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.40 เมื่อนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) พบว่าไม่แตกต่างจึงทำการคัดเลือกมาด้วย ทำให้สามารถคัดเลือกไอโซเลทที่จะนำไปศึกษาขั้นต่อไปได้ทั้งหมด 8 ไอโซเลท ได้แก่ FA05, FA06 FA18, FA39, FA40, FA50, FA61 และ FA68

ตารางที่ 4.3 อัตราส่วนวงใสต่อโคโลนิของเชื้อราเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง CMC ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

รหัสไอโซเลท	ค่าเฉลี่ย ϕ โคโลนิ (มม.)	ค่าเฉลี่ย ϕ วงใส (มม.)	ค่าเฉลี่ยอัตราส่วน วงใสต่อโคโลนิ
FA02	5.0	10.0	2.0 ^{fg}
FA04	48.2	58.0	1.2 ^h
FA05	5.0	13.0	2.6 ^e
FA06	5.0	40.0	8.0 ^b
FA10	5.0	9.0	1.8 ^g
FA18	5.0	20.0	4.0 ^d
FA21	57.3	57.3	1.0 ^h
FA23	66.2	67.2	1.0 ^h
FA26	5.0	9.0	1.8 ^g
FA39	5.0	12.0	2.4 ^{ef}
FA40	5.0	38.3	7.7 ^b
FA50	9.0	54.3	6.0 ^c
FA61	5.0	51.3	10.3 ^a
FA68	36.8	56.2	2.7 ^e

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแต่ละคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

ตารางที่ 4.4 ตารางสถิติแสดงค่าตำแหน่งเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 60 ของค่าอัตราส่วนวงใสต่อโคโลนีของเชื้อราเมื่อทดสอบด้วยวิธี congo red test บนอาหารแข็ง CMC ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

N	42
Std. Error of Mean	0.45
Std. Deviation	2.94
Variance	8.65
Range	9.60
Minimum	1.00
Maximum	10.60
ตำแหน่งเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 60	2.63

4.2.2.2 แบคทีเรีย

นำไอโซเลทแบคทีเรียที่คัดแยกได้ 150 ไอโซเลท จากข้อ 4.2.1 มาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยใช้วิธี agar spot test บนอาหารแข็ง CMC บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบด้วยวิธี congo red test ปรากฏผลการเกิดวงใสรอบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 41 ไอโซเลท ค่าอัตราส่วนวงใสต่อโคโลนีของแบคทีเรีย แสดงในตารางที่ 4.5 มีค่าเฉลี่ยในช่วง 1.00 – 2.40 จากนั้นคัดเลือกแบคทีเรียไอโซเลทที่ให้อัตราส่วนวงใสต่อโคโลนีที่มีค่าตั้งแต่ตำแหน่งเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 60 ขึ้นไป มาทดสอบความสามารถในการย่อยเซลลูโลสในขั้นต่อไป จากการใช้โปรแกรมทางสถิติคำนวณทำให้ทราบว่าตำแหน่งเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 60 ของค่าเฉลี่ยอัตราส่วนวงใสต่อโคโลนีของแบคทีเรียมีค่าเท่ากับ 1.32 (ตารางที่ 4.6) แต่เนื่องจากไอโซเลท BA158 BA83 BA78 BA71 BA15 BA06 BA74 BA41 BA79 BA56 และ BA60 มีค่าเฉลี่ยอัตราส่วนวงใสต่อขนาดโคโลนีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) จึงทำการคัดเลือกมาด้วย ทำให้สามารถคัดเลือกไอโซเลทที่จะนำไปศึกษาขั้นต่อไปได้ทั้งหมด 27 ไอโซเลท ได้แก่ BA06, BA08 BA14, BA15, BA36, BA40, BA41, BA44, BA47, BA56, BA60, BA71, BA72, BA74 BA77, BA78, BA79, BA83, BA95, BA98, BA100, BA118, BA137, BA140, BA158 BA167 และ BA170

ตารางที่ 4.5 อัตราส่วนวงใสต่อโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง CMC ที่ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

รหัสไอโซเลต	ค่าเฉลี่ย ϕ โคโลนี (มม.)	ค่าเฉลี่ย ϕ วงใส (มม.)	ค่าเฉลี่ยอัตราส่วน วงใสต่อโคโลนี
BA02	7.0	8.0	1.1 ^{klmn}
BA06	6.8	8.5	1.3 ^{fghi}
BA08	7.0	10.0	1.4 ^e
BA14	6.9	16.3	2.4 ^a
BA15	6.9	8.8	1.3 ^{fghi}
BA36	5.8	8.3	1.4 ^e
BA38	5.9	5.9	1.0 ^o
BA39	6.6	7.8	1.2 ^{klmn}
BA40	7.0	15.0	2.1 ^c
BA41	6.8	8.9	1.3 ^{fghij}
BA44	7.0	15.3	2.2 ^b
BA47	7.0	14.0	2.0 ^d
BA48	6.8	7.6	1.1 ^{klm}
BA56	7.1	8.8	1.2 ^{fghij}
BA57	6.2	7.0	1.1 ^{mn}
BA58	6.9	7.5	1.1 ^{lmn}
BA59	6.5	7.0	1.1 ^{mn}
BA60	7.5	9.0	1.2 ^{ghijk}
BA61	7.3	8.5	1.2 ^{klmn}
BA62	6.8	7.5	1.1 ^{no}
BA71	7.0	8.8	1.3 ^{fghi}
BA72	6.1	7.8	1.3 ^f
BA74	7.0	9.0	1.3 ^{fghij}
BA77	7.5	11.3	1.5 ^e
BA78	7.0	8.9	1.3 ^{fghi}
BA79	6.3	8.3	1.3 ^{fghij}
BA83	7.0	9.0	1.3 ^{fghi}
BA84	7.0	8.5	1.2 ^{ijkl}
BA86	6.8	7.5	1.1 ^{lmn}
BA95	6.3	9.1	1.5 ^e
BA98	6.6	9.3	1.4 ^e

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแต่ละคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

ตารางที่ 4.6 ตารางสถิติแสดงค่าตำแหน่งเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 60 ของค่าอัตราส่วนวงใสต่อโคโลนี ของเชื้อแบคทีเรียเมื่อทดสอบด้วยวิธี congo red test บนอาหารแข็ง CMC ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

N	123
Std. Error of Mean	0.03
Std. Deviation	0.35
Variance	0.12
Range	1.46
Minimum	1.00
Maximum	2.46
ตำแหน่งเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 60	1.32

4.2.2.3 แอคติโนมัยซิส

นำไอโซเลทแอคติโนมัยซิสที่คัดแยกได้ 34 ไอโซเลท จากข้อ 4.2.1 มาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง โดยใช้วิธีเช่นเดียวกับเชื้อราเป็นเวลา 5 วัน เมื่อทดสอบด้วยวิธี congo red test ปรากฏผลการเกิดวงใสรอบโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซิสทั้งหมด 6 ไอโซเลท ค่าอัตราส่วนวงใสต่อโคโลนีของแอคติโนมัยซิสแสดงในตารางที่ 4.7 จากผลการทดสอบพบว่าค่าเฉลี่ยอัตราส่วนวงใสต่อโคโลนีของเชื้อทั้ง 6 ไอโซเลท ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) จึงนำทั้ง 6 ไอโซเลทนี้ไปทดสอบในขั้นต่อไป

4.3 ผลการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยเซลลูโลสในอาหารเหลว

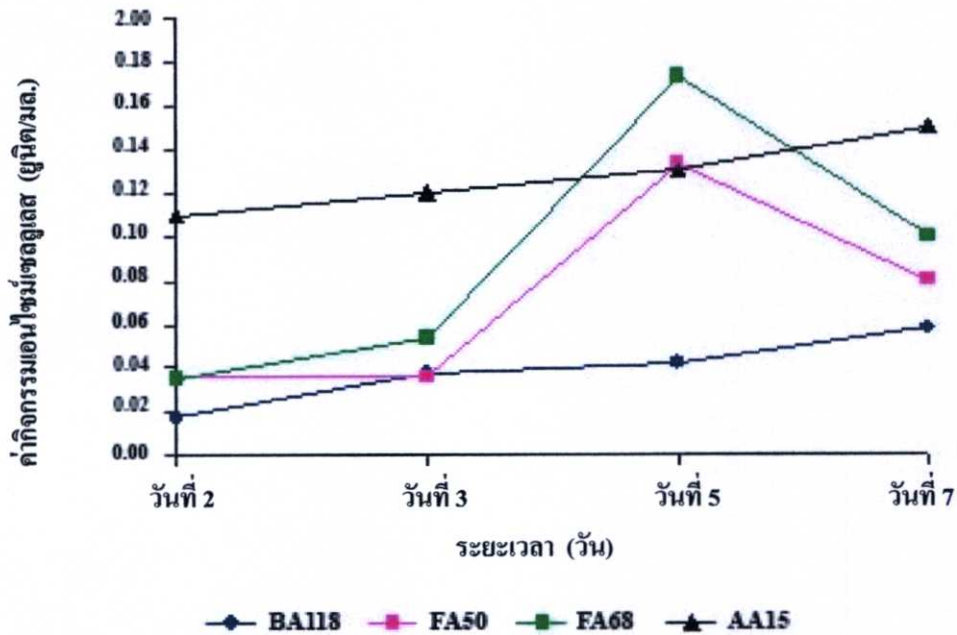
จากการคัดเลือกในขั้นที่ 1 (Primary screening) ข้อ 4.2.1 พบจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยเซลลูโลสที่อุณหภูมิสูง มีจำนวนทั้งสิ้น 198 ไอโซเลท จากนั้นนำมาคัดเลือกในขั้นที่ 2 (Secondary screening) ข้อ 4.2.2 เหลือเพียง 41 ไอโซเลท แบ่งเป็น 3 กลุ่มคือ รา แบคทีเรียและแอคติโนมัยซิส จำนวน 8, 27 และ 6 ไอโซเลท ตามลำดับ นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยเซลลูโลสในอาหารเหลวที่มีแอลฟาเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน (ภาคผนวก ก) เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน และทำการสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารเหลวมาวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CMCase ที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 2, 3, 5 และ 7 วัน (ค่าเฉลี่ยกิจกรรมเอนไซม์ CMCase ของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดแสดงในภาคผนวก ง) ผลการทดลองพบว่าเชื้อรา FA68 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 0.17 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 5 เมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลทอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) รองลงมาคือไอโซเลท FA50 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 0.13

ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Chanikarn (2005) ที่ทำการคัดเลือกเชื้อรา อุณหภูมิสูงที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากตัวอย่างดิน มูลสัตว์ ไม้ผุ ใบไม้ผุ ปุ๋ยหมัก ฟางข้าวและขัง ข้าวโพด และทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยเซลลูโลสในอาหารเหลวที่มี CMC เป็นแหล่งคาร์บอน พี เอช 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน พบว่าเชื้อรา *Aspergillus* sp. LA1 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CMCase สูงสุดมีค่าเท่ากับ 0.25 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าเชื้อรา FA68 เนื่องจากการใช้ สับสเตรตที่แตกต่างกันจึงส่งผลให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสที่วิเคราะห์ได้มีค่าน้อยกว่าการใช้ CMC เป็นสับสเตรตเนื่องจากสามารถละลายน้ำได้ทำให้เกิดการย่อยได้ดีกว่าการใช้ α -cellulose ซึ่งไม่ละลายน้ำ (Mandels และ Reese. 1960) ที่จึงคัดเลือกเชื้อรา 2 ไอโซเลทนี้มาศึกษาในขั้นต่อไป สำหรับเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ถูกคัดเลือกคือ ไอโซเลท BA118 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 0.06 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 7 (ตารางที่ 19 ในภาคผนวก ง) และเชื้อแอกติโนมัยซิส ไอโซเลทที่ถูกคัดเลือกคือ ไอโซเลท AA15 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 0.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 7 (ตารางที่ 20 ในภาคผนวก ง) และ จากรูปที่ 4.3 จะเห็นได้ว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อราทั้ง 2 ไอโซเลทที่ถูกคัดเลือกจะสูงสุดในวันที่ 5 และจะลดลงเมื่อเข้าสู่วันที่ 7 ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากการย่อยสลายเซลลูโลสจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นเซลโลไบโอสและกลูโคสซึ่งจะไปยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส สอดคล้องกับงานวิจัยของ Duff และคณะ (1985) ที่ได้ข้อสรุปจากการศึกษาปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสว่า เอนไซม์เซลลูเลสแต่ละตัวจะถูกยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เกิดจากการย่อยสลาย กล่าวคือกิจกรรมของเอนไซม์ exoglucanase จะถูกยับยั้งโดยเซลโลไบโอส เช่นเดียวกับกิจกรรมของเอนไซม์ β -glucosidase ที่ถูกยับยั้งโดยกลูโคส ส่วนแบคทีเรียและแอกติโนมัยซิส BA118 และ AA15 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 4.7 อัตราส่วนวงใสต่อโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซิสเมื่อเลี้ยงบนอาหาร CMC agar ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

รหัสไอโซเลท	ค่าเฉลี่ย ϕ โคโลนี (มม.)	ค่าเฉลี่ย ϕ วงใส (มม.)	ค่าเฉลี่ยอัตราส่วนวงใสต่อโคโลนี
AA05	8.3	38.0	3.5 ^a
AA 15	17.5	49.3	3.6 ^a
AA 41	14.3	50.0	3.5 ^a
AA 42	13.0	47.3	3.7 ^a
AA 43	13.3	50.3	3.8 ^a
AA 44	13.3	49.7	3.7 ^a

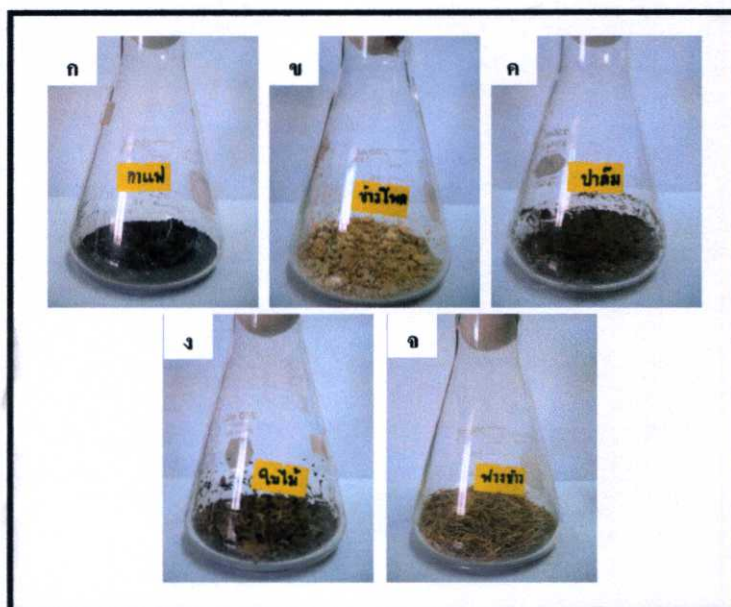
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์และในแถวที่มีตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT



รูปที่ 4.3 ค่ากิจกรรมแอมโมเนียเซลลูโลสของเชื้อแบคทีเรีย ราและแอคติโนมัยซิสทั้ง 4 ไอโซเลท ที่คัดเลือก เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

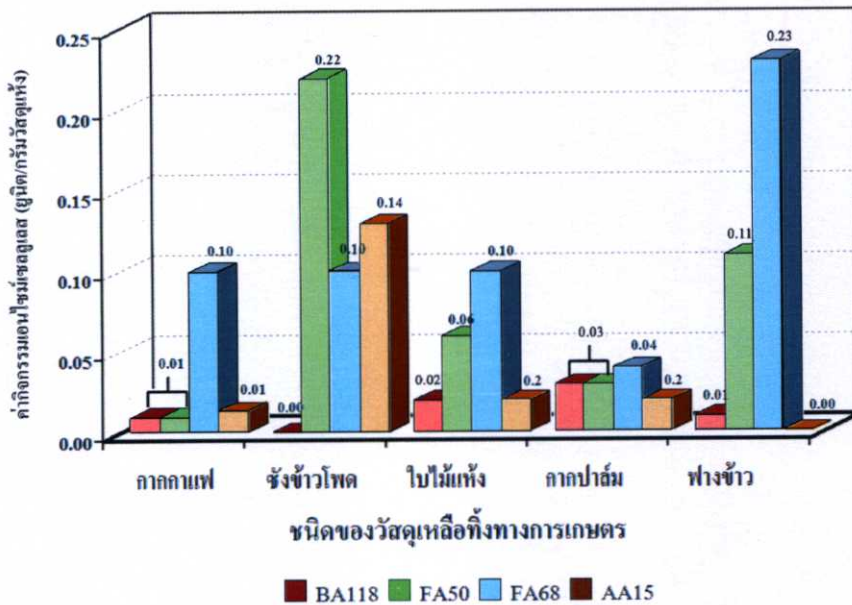
4.4 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่นำมาทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการย่อยเซลลูโลสจากวัสดุธรรมชาติทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ กากกาแฟ ชังข้าวโพด เศษใบไม้แห้ง กากปาล์ม และฟางข้าว (รูปที่ 4.4) โดยวัสดุทั้ง 5 ชนิดนี้จะมีองค์ประกอบของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสที่แตกต่างกันไป



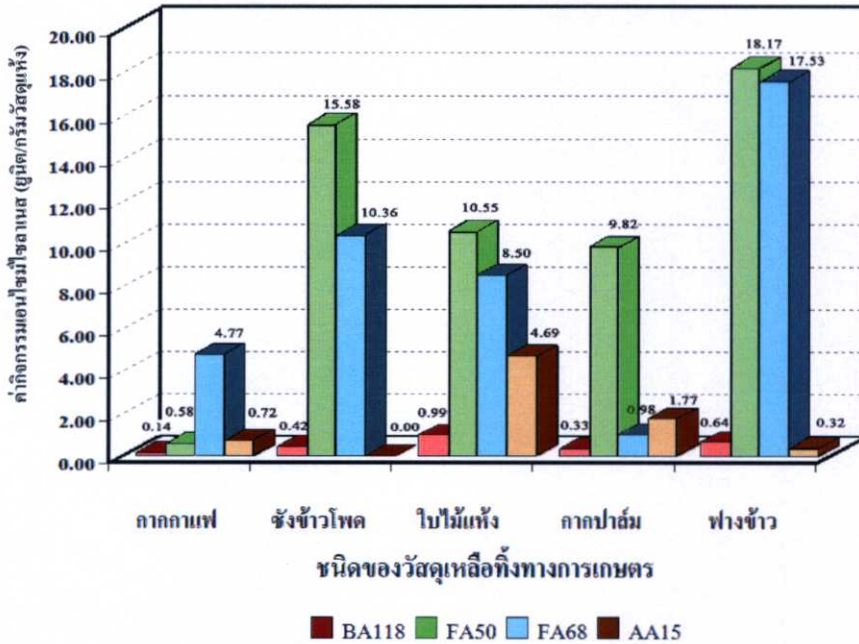
รูปที่ 4.4 วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (ก) กากกาแฟ (ข) ชังข้าวโพด (ค) กากปาล์ม (ง) ใบไม้แห้ง (จ) ฟางข้าว

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทมีความสามารถในการย่อยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสแตกต่างกัน โดยพิจารณาได้จากค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและไซลานเนส ตามลำดับ จากรูปที่ 4.5 และ 4.6 แสดงให้เห็นว่าเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการย่อยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสได้ดีกว่าแอสคิโนมัซซิสและแบคทีเรียโดยที่เชื้อรา FA68 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดเท่ากับ 0.23 ± 0.01 ยูนิตต่อกรัม ในวัสดุหมักที่เป็นฟางข้าว รองลงมาคือเชื้อรา FA50 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.22 ± 0.02 ยูนิตต่อกรัม จากรูปที่ 4.5 แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา FA68 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสในระดับที่สูงกว่าไอโซเลทอื่นในวัสดุหมักที่เป็นกากกาแฟ เศษใบไม้แห้งและกากปาล์มด้วย โดยมีค่าเท่ากับ 0.10 ± 0.01 , 0.10 ± 0.00 และ 0.04 ± 0.00 ยูนิตต่อกรัม ตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัยของ De Boer และคณะ (2005) ที่พบว่าเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลสที่มีโครงสร้างซับซ้อน เช่น ในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรได้ดีกว่าแบคทีเรียและแอสคิโนมัซซิส



รูปที่ 4.4 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสที่เกิดจากการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรของเชื้อแบคทีเรีย ราและแอสคิโนมัซซิสทั้ง 4 ไอโซเลท ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

ผลการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสพบว่า ในวัสดุหมักที่เป็นฟางข้าวเชื้อรา FA50 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสสูงที่สุด มีค่าเท่ากับ 18.17 ± 0.19 ยูนิตต่อกรัม รองลงมาคือเชื้อรา FA68 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนส เท่ากับ 17.53 ± 0.02 ยูนิตต่อกรัม นอกจากนี้เชื้อรา FA50 ยังให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสในปริมาณที่สูงกว่าจุลินทรีย์ไอโซเลทอื่นในวัสดุหมักที่เป็นซังข้าวโพด เศษใบไม้แห้ง และกากปาล์มด้วย โดยมีค่าเท่ากับ 15.58 ± 0.74 , 10.55 ± 0.17 และ 9.82 ± 0.28 ยูนิตต่อกรัม ตามลำดับ



รูปที่ 4.5 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซทานเนสที่เกิดจากการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรของเชื้อแบคทีเรีย ราและแอคติโนมัยซิสทั้ง 4 ไอโซเลท ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

เมื่อพิจารณาประเภทของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่นำมาทดสอบจะเห็นได้ว่าเมื่อใช้กากปาล์มเป็นวัสดุหมักค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์ทั้ง 4 ไอโซเลท มีค่าในระดับต่ำใกล้เคียงกันทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากน้ำมันที่หลงเหลืออยู่มีผลให้ความสามารถในการดูดซับความชื้นของวัสดุไม่ดี ทำให้เกิดการแยกชั้นของน้ำกับกากปาล์มหรืออาจกล่าวได้ว่ามีปริมาณน้ำอิสระ (free water) และเมื่อระยะเวลาการบ่มผ่านไปทำให้น้ำส่วนนั้นระเหยไปส่งผลให้วัสดุจับตัวกันแน่นทำให้การระบายอากาศไม่ดี จากการทดลองจะสังเกตได้ว่าเชื้อจะขึ้นเฉพาะที่พื้นผิวส่วนบนของกากปาล์มเท่านั้น ซึ่งทั้งหมดนี้ล้วนเป็นปัจจัยที่ส่งเสริมต่อการเจริญของจุลินทรีย์และส่งผลต่อการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสและไซทานเนสซึ่งเป็นสารปฐมภูมิ (primary metabolite) (Nishio และคณะ. 1981)

4.5 ผลการศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ถูกคัดเลือก

4.5.1 แบคทีเรีย BA118

4.5.1.1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

การออกแบบผลการออกแบบการทดลองโดยใช้พื้นที่ผิวการตอบสนอง (RSM) โดยมีตัวแปร (variable) ที่เลือกศึกษาและมีอิทธิพลต่อการผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียจำนวน 3 ตัวแปรคือ ค่าพีเอชเริ่มต้น อุณหภูมิและอัตราการเขย่า วางแผนการทดลองแบบ CCD ทำให้ได้ชุดการทดลองทั้งหมด 20 การทดลอง ผลการศึกษาการเจริญของเซลล์โดยพิจารณาจากค่าความขุ่นของเซลล์แบคทีเรีย BA 118 ที่เวลา 24 ชั่วโมง ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโน

เมตร แสดงดังตารางที่ 4.8 เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS เวอร์ชัน 11.5 เพื่อหาความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง ค่าพีเอชเริ่มต้น อุณหภูมิและอัตราการเขย่า และสร้างสมการถดถอยเชิงเส้นตรงด้วยโปรแกรม Statistica เวอร์ชัน 5.0 เพื่อทำนายค่าตอบสนอง ในการสร้างสมการความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรนั้น ได้กำหนดค่าความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ($p < 0.05$) จากนั้นทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยการพิจารณาค่า p-value ของสัมประสิทธิ์แต่ละตัวแปรที่แสดงในตารางที่ 4.9 โดยพจน์ที่มีความสำคัญต่อค่าความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 นั้นต้องมีค่า p-value น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05 ตัวแปรนั้นจึงจะปรากฏในสมการ จากนั้นพิจารณาความเหมาะสมของแบบจำลองโดยพิจารณาจากค่า F ที่ได้จากการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของแบบจำลองด้วยโปรแกรม SPSS ซึ่งแบบจำลองจะมีค่าความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ก็ต่อเมื่อค่า F ที่ได้จากโปรแกรมต้องมีค่าน้อยกว่าค่า F ที่ได้จากการเปิดตารางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ (α) เท่ากับ 0.05 (ศิริชัย พงษ์วิชัย, 2548)

ตารางที่ 4.8 ค่าความขุ่นของเซลล์แบคทีเรีย BA 118 เมื่อเลี้ยงในอาหาร NB เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในสภาวะที่ได้จากแผนการทดลองแบบ CCD

การทดลองที่	พีเอชเริ่มต้น	อุณหภูมิ	อัตราการเขย่า	ค่าเฉลี่ย OD ₆₀₀
1	4	29	150	0.06 ± 0.00
2	4	29	250	0.00 ± 0.00
3	4	45	150	0.00 ± 0.00
4	4	45	250	0.04 ± 0.01
5	10	29	150	0.00 ± 0.00
6	10	29	250	0.00 ± 0.00
7	10	45	150	0.00 ± 0.00
8	10	45	250	0.00 ± 0.00
9	1.95	37	200	0.05 ± 0.00
10	12.05	37	200	0.00 ± 0.00
11	7	23.5	200	0.92 ± 0.01
12	7	50.4	200	0.67 ± 0.08
13	7	37	116	1.15 ± 0.03
14	7	37	284	0.71 ± 0.04
15	7	37	200	1.35 ± 0.00
16	7	37	200	1.36 ± 0.01
17	7	37	200	1.34 ± 0.01
18	7	37	200	1.35 ± 0.01
19	7	37	200	1.38 ± 0.01
20	7	37	200	1.36 ± 0.01

1. การหาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (β_i)

ดำเนินการหาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของแต่ละตัวแปร (X_i) โดยโปรแกรม statistica เวอร์ชัน 5.0 และใช้วิธี Response Surface Regression ในการหาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย ได้ผลลัพธ์ดังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 แสดงค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของแต่ละตัวแปร (X_i) โดยโปรแกรม SPSS

Factors	Code	Coefficients	Unstandardized Coefficients		t-value	p-value*
			β_i	Standard error		
Constant		β_0	1.37	0.06	24.37	0.00
PH	X_1	β_1	-0.01	0.04	-0.33	0.74
Temp	X_2	β_2	-0.03	0.04	-0.87	0.39
Shake	X_3	β_3	-0.06	0.04	-1.48	0.15
PH ²	X_1^2	β_{11}	-0.58	0.04	-15.97	0.00 *
Temp ²	X_2^2	β_{22}	-0.31	0.04	-8.47	0.00 *
Shake ²	X_3^2	β_{33}	-0.26	0.04	-7.19	0.00 *
PH x Temp	$X_1 X_2$	β_{12}	0.00	0.05	0.04	0.97
PH x Shake	$X_1 X_3$	β_{13}	0.00	0.05	0.04	0.97
Temp x Shake	$X_2 X_3$	β_{23}	0.01	0.05	0.26	0.79

Coefficient of correlation (R^2) = 0.932 , Coefficient of determination (adj. R^2) = 0.845

หมายเหตุ : สัมประสิทธิ์การถดถอยที่กำกับด้วย * แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

โดยที่

Coefficients คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (β_i) ของแต่ละตัวแปร
t-value คือ สถิติที่ใช้ทดสอบสมมติฐาน
p-value คือ ค่าความน่าจะเป็นที่ระดับนัยสำคัญ (α) เท่ากับ 0.05

จากตารางที่ 4.9 เมื่อนำค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของแต่ละตัวแปร (β_i) ไปแทนในสมการที่ 1 จะได้สมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระหว่างการเจริญของเซลล์กับตัวแปรอิสระ (ค่าพีเอชเริ่มต้น อุณหภูมิและอัตราการเขย่า) ดังสมการที่ 2

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 \quad \dots\dots 1$$

$$Y = 1.37 - 0.01 X_1 - 0.03 X_2 - 0.06 X_3 - 0.58 X_1^2 - 0.31 X_2^2 - 0.26 X_3^2 + 0.00 X_1 X_2 + 0.00 X_1 X_3 + 0.01 X_2 X_3 \quad \dots\dots 2$$

หมายเหตุ	:	Y	คือ	ปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่สูงสุดโดยวัดจากค่าความขุ่น
		X_1	คือ	ค่าพีเอชเริ่มต้น
		X_2	คือ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
		X_3	คือ	อัตราการเขย่า (รอบ/นาที)

2. การวิเคราะห์นัยสำคัญของค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (β_i) ของแต่ละตัวแปร

(Test on Individual Regression Coefficients)

เมื่อได้ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยดังสมการที่ 2 แล้ว ขั้นตอนต่อไปเป็นขั้นตอนของการทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย ซึ่งเป็นการทดสอบว่าตัวแปรอิสระ (X_i) แต่ละตัวในสมการที่ 2 นั้นมีอิทธิพลหรือไม่ต่อตัวแปรตาม (ปริมาณเซลล์แบคทีเรีย) โดยกำหนดสมมติฐานดังนี้

$$H_0: \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k = 0 \quad \text{ตัวแปรอิสระที่ } i (X_i) \text{ ไม่มีอิทธิพลต่อตัวแปรตาม}$$

$$H_1: \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k \neq 0 \quad \text{ตัวแปรอิสระที่ } i (X_i) \text{ มีอิทธิพลต่อตัวแปรตาม}$$

จากตารางเมื่อพิจารณาในส่วนของ Linear Terms ได้แก่ X_1 , X_2 และ X_3 มีค่า p-value เท่ากับ 0.74, 0.39 และ 0.15 ตามลำดับ ที่ระดับนัยสำคัญ (α) เท่ากับ 0.05 พบว่าค่า p-value ของตัวแปรอิสระทั้ง 3 ตัว มีค่ามากกว่า 0.05 แสดงว่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์กับตัวแปรอิสระ X_1 , X_2 และ X_3 ไม่เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า ตัวแปรอิสระ X_1 , X_2 และ X_3 ไม่สามารถนำไปใช้ในการพยากรณ์ในสมการที่ 2 ได้

ลำดับต่อไปพิจารณาส่วนของ Square Terms อันได้แก่ X_1^2 , X_2^2 และ X_3^2 พบว่ามีค่า p -value เท่ากับ 0.00 ทุกตัวแปร และมีค่าน้อยกว่า 0.05 แสดงว่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์แบคทีเรียกับตัวแปรอิสระ X_1^2 , X_2^2 และ X_3^2 เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า X_1^2 , X_2^2 และ X_3^2 สามารถนำไปใช้ในการพยากรณ์สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย BA118 ในสมการที่ 2 ได้

สุดท้ายพิจารณาส่วนของ Interaction Terms ได้แก่ $X_1 X_2$, $X_1 X_3$ และ $X_2 X_3$ พบว่ามีค่า p -value เท่ากับ 0.97, 0.97 และ 0.79 ตามลำดับ ที่ระดับนัยสำคัญ (α) 0.05 จะเห็นได้ว่าค่า p -value ของตัวแปรอิสระทุกตัวในส่วนของ Interaction Terms มีค่ามากกว่า 0.05 แสดงว่า ตัวแปรอิสระ $X_1 X_2$, $X_1 X_3$ และ $X_2 X_3$ ไม่มีอิทธิพลต่อปริมาณเซลล์แบคทีเรีย ดังนั้นตัวแปรอิสระดังกล่าวจึงไม่ควรอยู่ในสมการที่ 2 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เมื่อพิจารณาครบทุกส่วนแล้วสามารถเขียนสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระหว่าง การเจริญของเซลล์กับตัวแปรอิสระ (ค่าพีเอชเริ่มต้น, อุณหภูมิและอัตราการเขย่า) ดังสมการที่ 3 กำหนดค่าความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

$$Y = 1.37 - 0.58 X_1^2 - 0.31 X_2^2 - 0.26 X_3^2 \quad \dots\dots 3$$

หมายเหตุ	:	Y	คือ	การเจริญของเซลล์โดยวัดจากค่าความขุ่น
		X_1	คือ	ค่าพีเอชเริ่มต้น
		X_2	คือ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
		X_3	คือ	อัตราการเขย่า (รอบ/นาที)

3. การวิเคราะห์นัยสำคัญของแบบจำลอง (Test for Significant of Regression)

เป็นการทดสอบค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย β_i ของตัวแปรอิสระทุกตัวพร้อม ๆ กัน โดยกำหนดสมมติฐานดังนี้

$$H_0: \beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_k = 0 \quad \text{ตัวแปรอิสระทุกตัวไม่มีอิทธิพลต่อตัวแปรตาม}$$

$$H_1: \beta_j \neq 0 \quad \text{มีตัวแปรอิสระอย่างน้อย 1 ตัวที่มีอิทธิพลต่อตัวแปรตาม}$$

ในการทดสอบสมมติฐานจะพิจารณาจากผลรวมกำลังสองทั้งหมด (SST: Total Sum of Squares) ซึ่งเป็นผลบวกระหว่างผลรวมกำลังสองของค่าความคลาดเคลื่อนจากตัวแบบ (SSR: Sum

of Squares due to Regression) กับผลรวมกำลังสองของค่าความคลาดเคลื่อนจากส่วนตกค้าง (SSE: Sum of Squares due to Residual error) สถิติที่ใช้ทดสอบสมมติฐานคือ ค่า F ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้โดยใช้โปรแกรม SPSS ผลการวิเคราะห์พบว่าค่า F ที่ได้จากโปรแกรม แสดงในตารางที่ 4.10 มีค่าเท่ากับ 36.856 แต่ค่า F ที่เปิดจากตารางสถิติมีค่าเท่ากับ 6.16 ($F_{0.05,6,4}$) เมื่อกำหนดระดับนัยสำคัญ (α) เป็น 0.05 แสดงว่าแบบจำลองมีความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 เนื่องจากค่า F ที่ได้จากตารางสถิติมีค่าน้อยกว่าค่า F ที่ได้จากโปรแกรม ดังนั้นจึงปฏิเสธ H_0 ทำให้สรุปได้ว่า มีตัวแปรอิสระอย่างน้อย 1 ตัวที่มีอิทธิพลต่อตัวแปรตาม (การเจริญของเซลล์) สามารถนำไปพยากรณ์ในตัวแบบได้ นอกจากนี้จะพิจารณาจากค่า F แล้ว ยังสามารถพิจารณาได้จากค่า p -value ของตัวแบบ (Regression Model) ได้ด้วย โดยจะปฏิเสธ H_0 ก็ต่อเมื่อ p -value มีค่าน้อยกว่าระดับนัยสำคัญที่กำหนด จากตารางที่ 4.10 แสดงให้เห็นว่า p -value ของตัวแบบมีค่าเท่ากับ 0.000 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าระดับนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังนั้นจึงปฏิเสธ H_0 (Myers และ Montgomery, 2002)

ตารางที่ 4.10 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของแบบจำลองเพื่อคำนวณหาค่า F

Source	Sum of Squares (SS)	df	Mean Square (MS)	F-value	p-value
Regression	18.982	9	2.109	36.856	0.000
Residual Error	2.861	50	0.057		
Total	21.843	59			

โดยที่

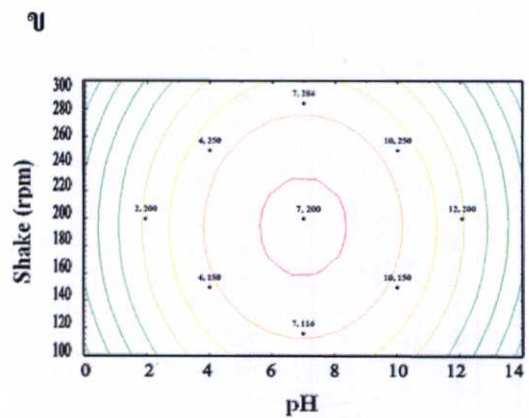
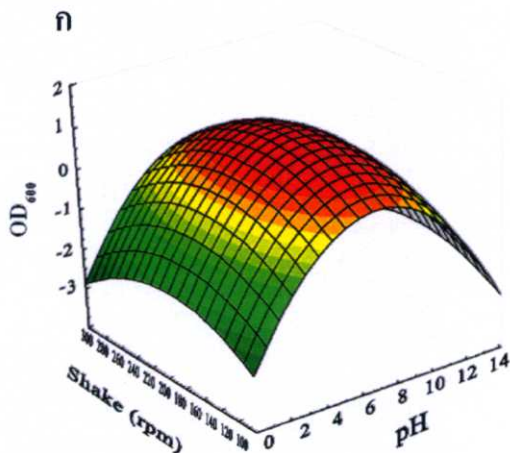
- SS คือ ผลบวกกำลังสอง (Sum of Square)
- df คือ องศาความเป็นอิสระ (Degrees of Freedom)
- F-value คือ สถิติที่ใช้ในการทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับความแปรปรวน
- p-value คือ ค่าความน่าจะเป็นที่ระดับนัยสำคัญ (α) เท่ากับ 0.05

4. การวิเคราะห์อิทธิพลของตัวแปรต่อการเจริญของเซลล์

เมื่อนำข้อมูลค่าความขุ่นของเซลล์แบคทีเรีย BA118 ที่ได้จากการทดลองทั้ง 20 การทดลองในตารางที่ 4.8 มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Statistica เวอร์ชัน 5.0 เพื่อดูผลของอันตรกิริยาระหว่างตัวแปร โดยโปรแกรมจะแสดงผลออกมาในรูปของกราฟแบบ 3 มิติ (Response surface plot) และกราฟเส้นโครงร่าง 2 มิติ (Contour plot) ดังนี้

อิทธิพลของค่าพีเอชเริ่มต้นและอัตราการเขย่า

จากรูปที่ 4.7 แสดงถึงอิทธิพลของค่าพีเอชเริ่มต้นและอัตราการเขย่าที่ส่งผลต่อการเจริญของเซลล์ รูปที่ 4.7 (ก) จะเห็นได้ว่าลักษณะของกราฟเป็นรูปโดม (Dome shape) แสดงว่าทั้งค่าพีเอชและอัตราการเขย่าต่างก็มีผลต่อเจริญของเซลล์แบคทีเรีย BA118 และในรูปที่ 4.7 (ข) แสดงให้เห็นจุดที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์แบคทีเรีย BA118 คือจุดที่อยู่ในพื้นที่วงกลมวงในสุด สีแดง (มีค่าพีเอชเริ่มต้นประมาณ 7.0 และอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที) จะได้ค่าความขุ่นของเซลล์สูงที่สุด

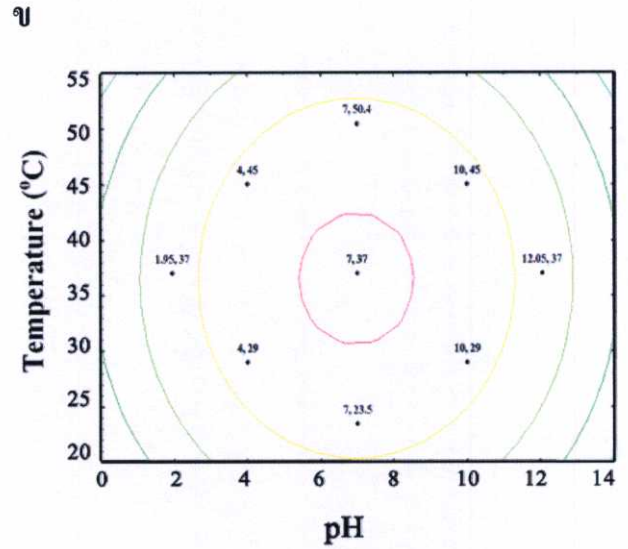
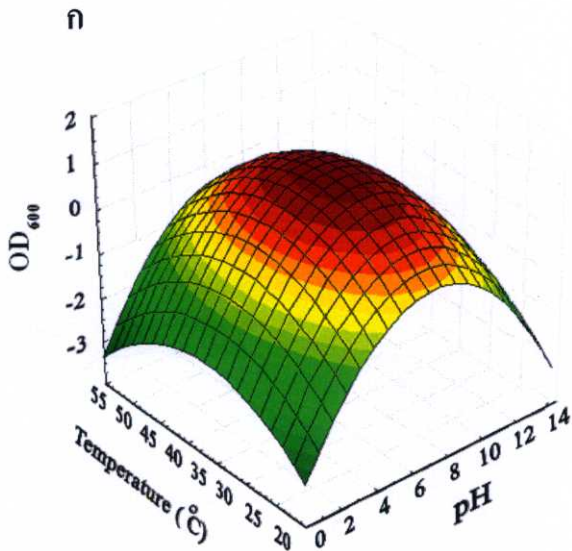


รูปที่ 4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของพีเอชเริ่มต้นและอัตราการเขย่าที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์

(ก) กราฟ 3 มิติ (Response surface plot) (ข) กราฟเส้นโครงร่าง 2 มิติ (Contour plot)

อิทธิพลของพีเอชเริ่มต้นและอุณหภูมิ

จากรูปที่ 4.8 (ก) และ (ข) แสดงอิทธิพลของค่าพีเอชเริ่มต้นและอุณหภูมิต่อการเจริญของเซลล์ พบว่าลักษณะของพื้นผิวผลตอบสนองเป็นรูปโดม แสดงว่าทั้งค่าพีเอชและอุณหภูมิต่างก็มีผลต่อเจริญของเซลล์แบคทีเรีย BA118 จุดที่ให้ค่าการเจริญของเซลล์สูงที่สุด คือที่ค่าพีเอชเริ่มต้น 6.63 อุณหภูมิ 36.58 องศาเซลเซียส

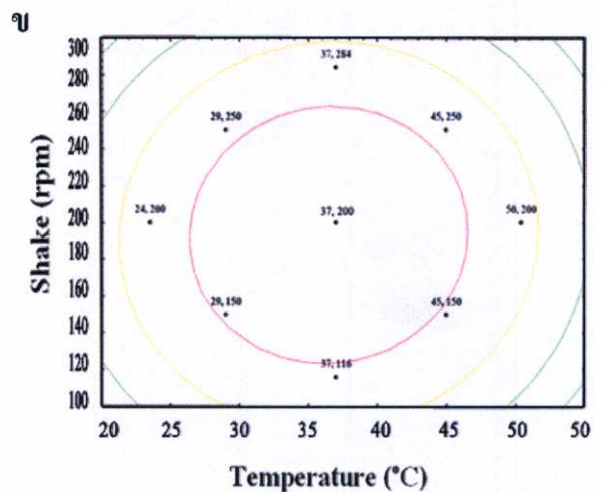
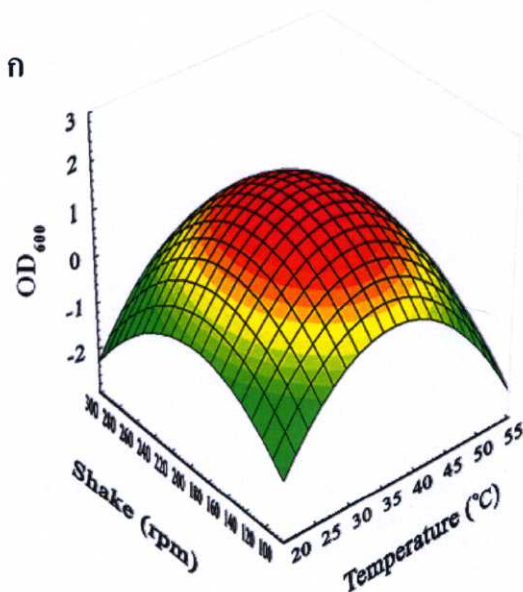


รูปที่ 4.7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของพีเอชเริ่มต้นและอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์

(ก) กราฟ 3 มิติ (Response surface plot) (ข) กราฟเส้น โคจรร่าง 2 มิติ (Contour plot)

อิทธิพลของอุณหภูมิและอัตราการเขย่า

จากรูปที่ 4.9 (ก) และ (ข) แสดงอิทธิพลของอุณหภูมิและอัตราการเขย่าต่อการเจริญของเซลล์ พบว่าลักษณะของพื้นผิวผลตอบสนองเป็นรูปโดมเช่นกันกันแสดงว่าอุณหภูมิและอัตราการเขย่ามีผลต่อการเจริญของเซลล์แบคทีเรีย BA118 จุดที่ให้ค่าการเจริญของเซลล์สูงสุดคือที่ อุณหภูมิ 36.58 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 194.74 รอบต่อนาที



รูปที่ 4.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของอุณหภูมิเริ่มต้นและอัตราการเขย่าที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์

(ก) กราฟ 3 มิติ (Response surface plot) (ข) กราฟเส้น โคจรร่าง 2 มิติ (Contour plot)

จากกราฟพื้นที่ผิวการตอบสนองในรูป 4.7-4.9 จะเห็นได้ว่าลักษณะของกราฟเป็นรูปโดม จุดยอดของกราฟ (บริเวณสีแดง) จะให้ค่าการตอบสนองสูงที่สุด เมื่อเลขจุดที่เหมาะสมออกไปผลที่ได้ก็คือค่าการตอบสนองจะลดลง จึงสามารถสรุปได้ว่าทั้ง 3 ปัจจัยมีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย BA118 เมื่อพิจารณาอิทธิพลของค่าพีเอชต่อการเจริญของเซลล์แบคทีเรียพบว่าการเจริญมีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อค่าพีเอชเพิ่มขึ้นจาก 1.95 จนถึง 7.0 และเริ่มลดลงจนกระทั่งไม่พบการเจริญเมื่อค่าพีเอชเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 12.0-10.0 เนื่องมาจากค่าพีเอชมีผลต่อโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีน รวมทั้งประจุของกรดอะมิโนในสายโพลีเพปไทด์ ในกรณีที่ค่าพีเอชสูงหรือต่ำเกินไปจะทำให้การทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์หยุดการทำงาน ทำให้เซลล์หยุดการเจริญและตายในที่สุด ซึ่งโดยปกติแล้วค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียมีค่าประมาณ 6.0-8.0 ยกเว้นในพวกที่ทนกรดและด่าง (Sherman และ Albus, 1923)

และสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญที่คำนวณได้จากสมการที่ 3 จะได้ว่า ค่าพีเอชเริ่มต้น เท่ากับ 6.63 อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ 36.6 องศาเซลเซียส และความเร็วรอบในการเขย่า 195 รอบต่อนาที จะได้ค่าความขุ่นของเซลล์สูงสุดมีค่าเท่ากับ 1.36 มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of Determination : R^2) เท่ากับ 0.932 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

4.5.2 เชื้อรา

เพื่อหลีกเลี่ยงการทดลองแบบ One-Factor-At-A-Time (OFAT) ซึ่งเป็นวิธีการทดลองที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในงานวิทยาศาสตร์และวิศวกรรม โดยวิธีการทดลองแบบนี้เริ่มต้นจากการกำหนดค่าเริ่มต้นของปัจจัยตัวที่หนึ่งแล้วเปลี่ยนระดับการทดลองของปัจจัยตัวดังกล่าวแล้วกำหนดให้ปัจจัยตัวอื่น ๆ มีค่าคงที่ เมื่อได้ค่าที่ดีที่สุดแล้วจึงกำหนดระดับของปัจจัยตัวที่หนึ่งนี้ให้มีค่าคงที่ จากนั้นจึงทำการเปลี่ยนระดับปัจจัยตัวที่สอง ทำอย่างนี้ไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งครบทุกปัจจัยที่ต้องการศึกษา ซึ่งมีข้อเสียคือไม่มีการประมาณผลกระทบเนื่องจาก interaction และอีกอย่างหนึ่งวิธีการนี้ไม่ได้รับรองว่าระดับต่าง ๆ ที่ได้จากผลการทดลองนั้น จะให้ค่าการตอบสนอง (response) ที่ดีที่สุด ดังนั้นในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราและแอสคิโนมัซซิสซึ่งทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งโดยใช้เมล็ดข้าวฟ่างเป็นตัวยัดเกาะ ปัจจัยที่ทำการศึกษามีเพียง 2 ปัจจัยคือ อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อและปริมาณความชื้นเริ่มต้นของเมล็ดข้าวฟ่าง เนื่องจากการปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของเมล็ดข้าวฟ่างทำได้ยากทั้งนี้อาจมีผลมาจากในเมล็ดข้าวฟ่างมีองค์ประกอบของสารอาหารเช่น โปรตีน น้ำตาล เป็นต้น ภายหลังจากทำการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเมล็ดข้าวฟ่างจะสุกและแตกออกทำให้สารอาหารที่อยู่ภายในซึ่งมีประจุเมื่อละลายเข้ากับน้ำที่ผ่านการปรับค่าพีเอชแล้วส่งผลให้ค่าพีเอชหลังการนึ่งฆ่าเชื้อคลาดเคลื่อนไปจากเดิม ดังนั้นจึงเลือกวางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล 4 x 4 และแผนการทดลองแบบสุ่มตลอดโดย

สมบูรณ์ (CRD) ศึกษา 2 ปัจจัยคือ ดังนี้ อุณหภูมิที่ทำการศึกษามี 4 ระดับ คือ 30, 37, 45 และ 50 องศาเซลเซียส และปริมาณความชื้นเริ่มต้น 4 ระดับ คือ ร้อยละ 50, 60, 80 และ 100 รวม 16 สิ่งทดลองจากการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราทั้ง 2 ไอโซเลท คือที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 วัน ซึ่งค่าร้อยละความชื้นเริ่มต้นที่ได้จากการทดลองมีค่าสอดคล้องกับงานวิจัยของวิเชียร กิจปรีชาวนิช และคณะ (2535) ที่ศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสและไซแลนจากวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมโดยเชื้อ *Aspergillus fumigatus* Fresenius รหัส 4-45-IE พบว่าความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์คือที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80 นอกจากนี้เชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* แล้ว Kim และคณะ (1985) พบว่า *Talaromyces* sp. และ *Trichoderma viride* มีการเจริญและผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดที่ระดับความชื้นใกล้เคียงกัน ที่สภาวะดังกล่าวพบว่าเชื้อรา FA50 และ FA68 มีจำนวนสปอร์สูงที่สุดเมื่อเทียบกับสภาวะอื่นแตกต่างกันมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) โดยมีจำนวนสปอร์เท่ากับ 3.0×10^9 และ 3.2×10^9 สปอร์/กรัมเมล็ดข้าวฟ่าง ตามลำดับ (ตารางที่ 4.10 และ 4.11) จึงใช้สภาวะนี้มาศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณหัวเชื้อราในขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.10 จำนวนสปอร์เฉลี่ยของเชื้อรา FA50 ที่อุณหภูมิและปริมาณความชื้นเริ่มต้นระดับต่าง ๆ

อุณหภูมิ (°C)	ปริมาณความชื้นเริ่มต้น (ร้อยละ)			
	50	60	80	100
30	8.8×10^7 ^d	3.0×10^8 ^d	1.7×10^8 ^d	4.6×10^8 ^{c d}
37	8.5×10^8 ^c	1.4×10^9 ^b	3.0×10^9 ^a	1.6×10^9 ^b
45	3.7×10^7 ^d	1.6×10^8 ^d	1.6×10^8 ^d	2.3×10^8 ^d
50	7.3×10^5 ^d	1.6×10^6 ^d	2.3×10^7 ^d	2.6×10^7 ^d

ตารางที่ 4.11 จำนวนสปอร์เฉลี่ยของเชื้อรา FA68 ที่อุณหภูมิและปริมาณความชื้นเริ่มต้นระดับต่าง ๆ

อุณหภูมิ (°C)	ปริมาณความชื้นเริ่มต้น (ร้อยละ)				
	40	50	60	80	100
30	1.6×10^6 h	6.7×10^6 fg	9.1×10^6 fg	1.6×10^7 e	2.2×10^7 d
37	8.8×10^5 h	1.1×10^7 f	2.6×10^7 c	3.2×10^7 b	3.9×10^7 a
45	6.6×10^5 h	1.9×10^6 h	4.7×10^6 gh	7.4×10^6 fg	2.2×10^7 cd

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์และในแถวที่มีตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

4.5.3 เชื้อแอกติโนมัยซิส AA15

ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแอกติโนมัยซิส AA15 โดยทำการทดลองแบบแฟคทอเรียล 3×5 ด้วยแผนการทดลองแบบสุ่มตลอดโดยสมบูรณ์ ศึกษา 2 ปัจจัยคือ อุณหภูมิ 3 ระดับ คือ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส และความชื้นเริ่มต้น 5 ระดับ คือร้อยละ 40, 50, 60, 80 และ 100 รวม 15 สิ่งทดลอง พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญคือที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 100 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 วัน ที่สภาวะดังกล่าวพบว่าเชื้อแอกติโนมัยซิส AA15 มีจำนวนสปอร์สูงที่สุดเมื่อเทียบกับสภาวะอื่นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) มีจำนวนสปอร์เท่ากับ 3.9×10^7 CFU / กรัมเมล็ดข้าวฟ่าง (ตารางที่ 4.12) จึงใช้สภาวะนี้มาศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณหัวเชื้อแอกติโนมัยซิสในขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.12 จำนวนโคโลนีเฉลี่ยของแอกติโนมัยซิส AA15 ที่อุณหภูมิและปริมาณความชื้นเริ่มต้นระดับต่าง

อุณหภูมิ (°C)	ปริมาณความชื้นเริ่มต้น (ร้อยละ)			
	50	60	80	100
30	1.8×10^7 h	2.2×10^8 g,h	5.2×10^8 e f	6.0×10^8 e f
37	4.0×10^8 fg	1.9×10^9 b	3.2×10^9 a	1.4×10^9 c
45	7.5×10^8 e	7.2×10^8 e	1.1×10^9 d	1.8×10^9 b
50	1.3×10^6 h	1.8×10^6 h	5.2×10^6 h	4.0×10^6 h

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์และในแถวที่มีตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

4.6 ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ถูกคัดเลือก

4.6.1 แบคทีเรีย ไอโซเลท BA118

ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท BA118 ในข้อ 4.5.1 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือที่อุณหภูมิ 36.6 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 6.63 ความเร็วรอบ 195 รอบต่อนาที จึงนำมาศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยติดตามการเจริญจากการวัดค่าความขุ่นของเซลล์ จากรูปที่ 4.10ก แสดงกราฟการเจริญ (growth curve) ของเชื้อแบคทีเรีย BA118 พบว่าการเจริญของเชื้อจะมีระยะ lag phase ประมาณ 3 ชั่วโมง แล้วจะเริ่มเข้าสู่ระยะ exponential phase จนถึงชั่วโมงที่ 12 เริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) เมื่อระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อผ่านไป 12 ชั่วโมง และที่ 16 ชั่วโมงเชื้อมีการเจริญสูงสุด มีค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600}) เท่ากับ 2.01 ± 0.03 จึงกล่าวได้ว่าระยะคงที่ (stationary phase) ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท BA118 คือที่เวลา 12-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นการเจริญจะลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่ 18 ชั่วโมงจนถึง 48 ชั่วโมง

หากเปรียบเทียบกับค่าความขุ่นของเซลล์แบคทีเรีย (ที่ OD_{600}) ที่ได้จากการทำนายโดยใช้สมการถดถอยพบว่าจะให้ค่าทำนายมีค่าเท่ากับ 1.36 แต่เมื่อทำการทดสอบเพื่อหาระยะเวลาที่ทำให้เซลล์เพิ่มในปริมาณสูงสุด ผลการทดลองพบว่า ที่สภาวะดังกล่าวเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้ค่าความขุ่นของเซลล์เท่ากับ 1.47 ± 0.03 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่าได้จากการคำนวณ

4.6.2 เชื้อแอกติโนมัยซิส ไอโซเลท AA15

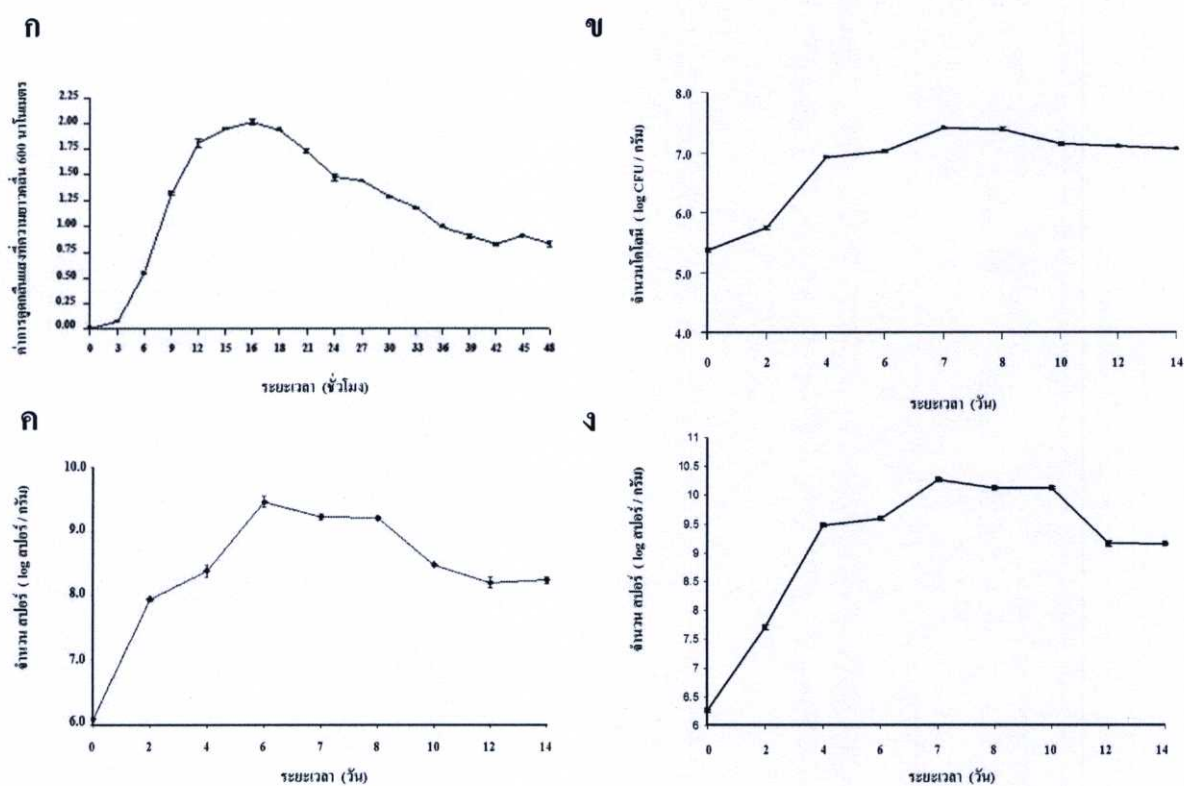
ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณหัวเชื้อแอกติโนมัยซิสไอโซเลท AA15 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 100 ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ พบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีแต่ช้ากว่าเมื่อเทียบกับเชื้อรา จากปริมาณเซลล์เริ่มต้น $5.38 \log CFU / \text{มิลลิลิตร}$ ($2.4 \times 10^5 CFU / \text{มิลลิลิตร}$) เมื่อเวลาผ่านไป 2 วัน มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเท่ากับ $5.75 \log CFU / \text{กรัมเมล็ดข้าวฟ่าง}$ และเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) ในวันที่ 6 - 8 ของการเลี้ยงเชื้อ ในวันที่ 7 มีปริมาณเซลล์สูงที่สุด เท่ากับ $7.41 \log CFU / \text{กรัมเมล็ดข้าวฟ่าง}$ คิดเป็น 1.38 เท่าของปริมาณเชื้อเริ่มต้น หลังจากเวลาผ่านไป 8 วัน จำนวนสปอร์ค่อย ๆ ลดลงและคงที่ในวันที่ 10 - 14 ของการเลี้ยงเชื้อ มีจำนวนสปอร์เท่ากับ $7.15 - 7.06 \log CFU / \text{กรัมเมล็ดข้าวฟ่าง}$ (รูปที่ 4.10 ข)

4.6.3 เชื้อรา

ไอโซเลท FA50

ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณหัวเชื้อราไอโซเลท FA50 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80 ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ พบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดี จากปริมาณสปอร์เริ่มต้น $6.08 \log$ สปอร์/มิลลิลิตร (1.2×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร) เมื่อ

เวลาผ่านไป 2 วัน มีจำนวนสปอร์เพิ่มขึ้นเท่ากับ 7.94 log สปอร์/กรัมเมล็ดข้าวฟ่าง และเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) ในวันที่ 5 - 8 ของการเลี้ยงเชื้อ ในวันที่ 5 มีปริมาณสปอร์สูงที่สุด เท่ากับ 9.46 log สปอร์/กรัมเมล็ดข้าวฟ่าง คิดเป็น 1.56 เท่าของปริมาณเชื้อเริ่มต้น หลังจากเวลาผ่านไป 8 วัน จำนวนสปอร์ค่อย ๆ ลดลงและคงที่ในวันที่ 12 - 14 ของการเลี้ยงเชื้อ มีจำนวนสปอร์เท่ากับ 8.2 - 8.24 log สปอร์/กรัมเมล็ดข้าวฟ่าง (รูปที่ 4.10 C)



รูปที่ 4.9 กราฟการเจริญของไอโซเลทที่ถูกคัดเลือก

(ก) BA118 (ข) AA15 (ค) FA50 (ง) FA68

ไอโซเลท FA68

ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณหัวเชื้อราไอโซเลท FA68 ที่สภาวะเดียวกันกับเชื้อราไอโซเลท FA50 พบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดี จากปริมาณสปอร์เริ่มต้น 6.26 log สปอร์/มิลลิลิตร (1.2×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร) เมื่อเวลาผ่านไป 2 วัน มีจำนวนสปอร์เพิ่มขึ้นเท่ากับ 7.71 log สปอร์/กรัมเมล็ดข้าวฟ่าง และเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) ในวันที่ 6-10 ของการเลี้ยงเชื้อ

ในวันที่ 6 มีปริมาณสปอร์สูงที่สุด เท่ากับ $10.27 \log$ สปอร์/กรัมเมล็ดข้าวฟ่าง คิดเป็น 1.64 เท่าของ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น หลังจากเวลาผ่านไป 8 วัน จำนวนสปอร์ค่อย ๆ ลดลงและคงที่ในวันที่ 12-14 ของ การเลี้ยงเชื้อ มีจำนวนสปอร์เท่ากับ $9.17 - 9.16 \log$ สปอร์/กรัมเมล็ดข้าวฟ่าง (รูปที่ 4.14)

4.7 ผลการจัดจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ในระดับจีโนม

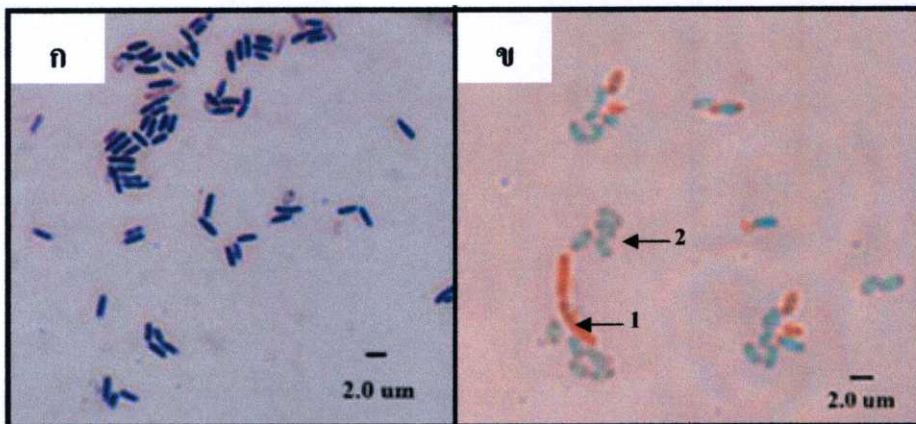
4.7.1 เชื้อแบคทีเรีย

เลือกโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียไอโซเลท BA118 มาศึกษาลักษณะรูปร่าง (morphology) ลักษณะสรีรวิทยา (physiology) และทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test) ซึ่งยึดตามแนวทางการจัด จำแนกแบคทีเรียจากหนังสือ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1 (Krieg และ คณะ. 1984) ผลการศึกษาพบว่าลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย BA118 ที่เจริญบนอาหาร NA โคโลนีมี ขนาดใหญ่รูปร่างไม่แน่นอน สีขาวครีม ผิวเรียบถึงขรุขระ ขอบหยัก (รูปที่ 4.10) เมื่อศึกษาลักษณะทาง สันฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยเทคนิคการย้อมแกรม และเทคนิคการย้อมสปอร์ พบว่าเซลล์มี รูปร่างเป็นท่อน (rod) เซลล์ติดสีแกรมบวก มีการสร้างสปอร์ (รูปที่ 4.11 ก) และเมื่อย้อมสีเอนโดสปอร์ จากเซลล์ที่เจริญบนอาหาร NA อายุ 48 ชั่วโมงและส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า พบ เซลล์ติดสีแดง สปอร์ติดสีเขียว (รูปที่ 4.11 ข) ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ แสดงใน ตารางที่ 4.11 จากคุณสมบัติเหล่านี้จึงจัดแบคทีเรีย BA118 อยู่ในสกุล *Bacillus* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมและเป็นกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายประกอบ ลิกโนเซลลูโลสได้ดี บางสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ได้มากกว่า 1 ชนิด Júlio และคณะ (2002) ได้ ทำการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลานเนสจากเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ที่ กัดแยกได้จากตัวอย่างดินและน้ำในแถบอเมซอน พบว่า *Bacillus subtilis* BL62 สามารถผลิตเอนไซม์ ทั้ง 2 ชนิดได้ โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 1.08 ยูนิตต่อมิลลิกรัม โปรตีน และค่า กิจกรรมกรรมเอนไซม์ไซลานเนสเท่ากับ 4.07 ยูนิตต่อมิลลิกรัม โปรตีน ที่ 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ในขณะที่ *Bacillus subtilis* BL53 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้เพียง 0.23 ยูนิตต่อมิลลิกรัม โปรตีน แต่ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้สูงกว่า *Bacillus subtilis* BL62 โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุด เท่ากับ 5.19 ยูนิตต่อมิลลิกรัม โปรตีน ที่ 72 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ *Bacillus* sp. สามารถทน ต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ที่มีอุณหภูมิสูง สภาวะที่มีค่าความเป็นกรดหรือด่างที่รุนแรง สภาวะที่มีความแห้งแล้ง สภาวะที่มีสารเคมี หรือสภาวะที่มีรังสีอัลตราไวโอเล็ต เป็นต้น เนื่องจาก สามารถสร้างสปอร์ได้และเมื่อสปอร์ของแบคทีเรียกลุ่มนี้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมหรือสภาวะที่มีความ

อุดมสมบูรณ์จะพัฒนาเป็นตัวเซลล์ต่อไป (Brown. 2000 ; Adam. 1999 ; Setlow และคณะ. 2004 และ Setlow. 2006)



รูปที่ 4.10 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BA118 บนอาหาร NA



รูปที่ 4.11 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BA118 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า (ก) รูปร่างของเซลล์ (ข) หมายเลข 1 คือ vegetative cell หมายเลข 2 คือ สปอร์

ตารางที่ 4.13 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BA118

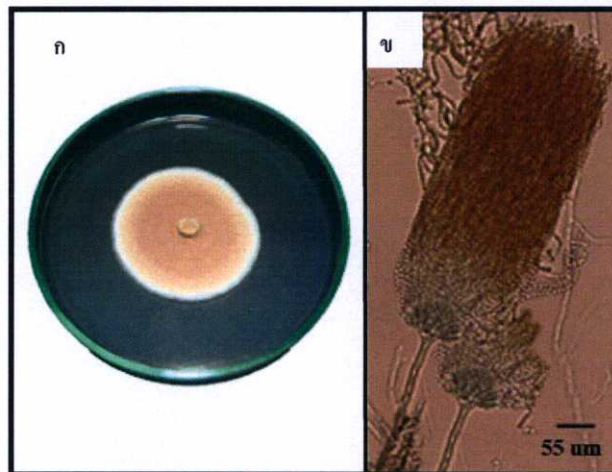
ลักษณะที่ศึกษา	<i>Bacillus</i> sp. BA118
รูปร่าง	ท่อน
แกรม	แกรมบวก
สปอร์ (ตำแหน่ง)	มี , อยู่ตรงกลางเซลล์
Anaerobic growth	+
Indole	-
Motility	+
Catalase	+
V-P reaction	+
Growth in 7% NaCl	+
Nitrate reduction	+
Starch hydrolysis	+
Gelatin hydrolysis	+
Growth at	
45	+
50	+
55	+
60	-
Acid from :	
glucose	+
mannitol	-
xylose	-
arabinose	-

หมายเหตุ : + หมายถึง ให้ผล positive

- หมายถึง ให้ผล negative

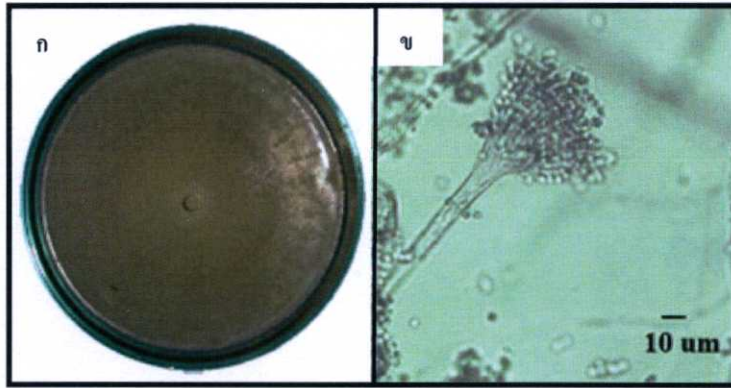
4.7.2 เชื้อรา

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลท FA50 พบว่าลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน มีลักษณะกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีประมาณ 4 เซนติเมตร เส้นใยสีขาว สปอร์สีน้ำตาล (รูปที่ 4.15 A) เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยมีผนังกัน เวสซิกิลก่อนข้างกลม การจัดเรียงตัวของสเตอริกมาเป็นแบบ biseriate เป็นรัศมีแผ่ออกจากศูนย์กลาง สปอร์มีรูปร่างกลม (รูปที่ 4.15 B) สำหรับเชื้อราไอโซเลท FA68 นั้นพบว่าสามารถเจริญอย่างรวดเร็วและสร้างสปอร์เป็นจำนวนมากบนอาหาร PDA ที่สภาวะเดียวกัน โคโลนีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีประมาณ 6 เซนติเมตร เส้นใยสีขาว สปอร์สีเขียว (รูปที่ 4.16 A) เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยมีผนังกัน เวสซิกิลก่อนข้างกลม การจัดเรียงตัวของ สเตอริกมาเป็นแบบ uniseriate สปอร์มีรูปร่างกลม (รูปที่ 4.16 B) ซึ่งจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ปรากฏนี้เป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อราในสกุล *Aspergillus* sp. จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราในสกุล *Aspergillus* sp. ตามวิธีของ Raper และ Funnell (1965) ซึ่งอาศัยลักษณะของ conidial head และสีของโคโลนี เมื่อจัดจำแนกชนิดเชื้อรา *Aspergillus* ตามคู่มือของ Klich (2002) ผลการศึกษาพบว่าเชื้อราไอโซเลท FA50 และ FA68 คือ *Aspergillus terreus* และ *Aspergillus fumigatus* ตามลำดับ ซึ่งเชื้อราในสกุล *Aspergillus* สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติและมีรายงานมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูโลสไลติกและไฮลาโนไลติกได้ดีโดยเฉพาะเอนไซม์ carboxymethyl cellulase หรือ endo- β -1,4-glucanase (Habib และคณะ. 2005)



รูปที่ 4.12 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Aspergillus* sp. FA50

(ก) เจริญบนอาหาร PDA (ข) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

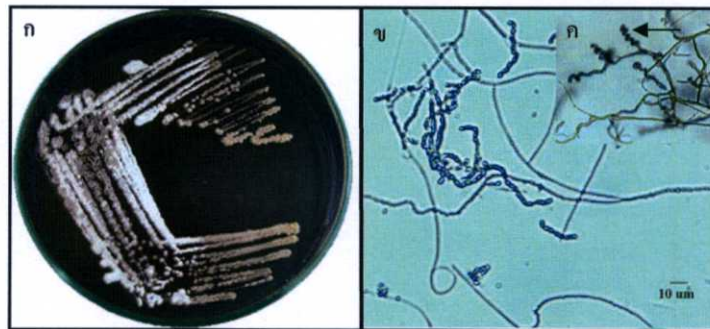


รูปที่ 4.13 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Aspergillus* sp. FA68

(ก) เจริญบนอาหาร PDA (ข) ลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

4.7.3 เชื้อแอกติโนมัยซิสไอโซเลท AA15

ผลการศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซิส AA15 บนอาหาร YMA เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) สีขาวฟู โคโลนีภายใต้อาหาร (substrate mycelium) มีสีเหลือง สร้างสารสีน้ำตาลแพร่ออกมาในอาหาร (รูปที่ 4.17ก) เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์มีลักษณะเป็นเส้นสายขนาดเล็ก (รูปที่ 4.17 ข) สร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายและมีลักษณะม้วนงอ (รูปที่ 4.17 ค) เมื่อนำไปทดสอบหาองค์ประกอบของผนังเซลล์ด้วยวิธี Thin layer chromatograph พบว่าเป็นแบบ LL-diamino-pimelic acid (LL-DAP) และไม่พบรูปแบบของน้ำตาลภายในเซลล์ (ภาคผนวก ค) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ แอกติโนมัยซิสสกุล *Streptomyces* sp.



รูปที่ 4.14 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยซิส AA15

(ก) เจริญบนอาหาร YMA (ข) ลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

(ค) ลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จุดมุ่งหมายของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เพื่อศึกษาและคัดเลือกจุลินทรีย์จากดินที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส เพื่อที่จะผลิตเป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์เร่งปุ๋ยหมักทำให้ลดระยะเวลาในการผลิตปุ๋ยหมักให้สั้นลง ผลการคัดเลือกจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินบริเวณต่าง ๆ ในจังหวัดกาญจนบุรีทั้ง 6 แห่ง ได้แก่ บ่อน้ำพุร้อนหินดาด วัดวังวิเวการาม โป่งพุร้อน อุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ พรุหนองปลิงและดินบริเวณเขื่อนวชิราลงกรณ รวมตัวอย่างดินทั้งสิ้น 20 ตัวอย่าง พบจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในอาหารทดสอบที่มีแอลฟาเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนมีลักษณะแตกต่างกัน รวมทั้งสิ้น 198 ไอโซเลท จำแนกเบื้องต้นได้เป็น เชื้อรา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยซิส ซึ่งเชื้อแบคทีเรียถูกพบมากที่สุด รองลงมาคือเชื้อราและแอคติโนมัยซิส จำนวน 14 150 และ 34 ไอโซเลท ตามลำดับ

ผลการคัดเลือกขั้นที่ 2 ด้วยวิธี congo red test บนอาหารที่มีคาร์บอกซีเมทิวเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อพิจารณาจากค่าอัตราส่วนวงใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี พบว่า 41 ไอโซเลท แบ่งเป็น 3 กลุ่มคือ รา แบคทีเรียและแอคติโนมัยซิสจำนวน 8 27 และ 6 ไอโซเลท ตามลำดับ ถูกคัดเลือกมาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยเซลลูโลสในอาหารเหลวที่มีแอลฟาเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน วิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CMCase ที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 2, 3, 5 และ 7 วัน ผลการทดลองสามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยเซลลูโลสในอาหารเหลวได้ทั้งสิ้น 4 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อรา 2 ไอโซเลท เชื้อแบคทีเรีย 1 ไอโซเลท และเชื้อแอคติโนมัยซิส 1 ไอโซเลท ซึ่งมีรหัส FA50, FA68 BA118 และ AA15 ตามลำดับ โดยเชื้อรา FA68 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 0.17 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (U/ml) ในวันที่ 5 รองลงมาคือเชื้อแอคติโนมัยซิส AA15 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 0.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตรในวันที่ 7 เชื้อรา FA50 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 0.13 ยูนิตต่อมิลลิลิตรในวันที่ 5 และเชื้อแบคทีเรีย BA118 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 0.06 ยูนิตต่อมิลลิลิตรในวันที่ 7

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร 5 ชนิด ได้แก่ กากกาแฟ ชังข้าวโพด เศษใบไม้แห้ง กากปาล์มและฟางข้าว โดยพิจารณาได้จากค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและไซลานเนส พบว่าเชื้อรามีประสิทธิภาพในการย่อยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสได้ดีกว่าแอคติโนมัยซิสและแบคทีเรียที่ โดยไอโซเลท FA68 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดในวัสดุหมักที่เป็นฟางข้าวมีค่าเท่ากับ 0.23 ± 0.01 ยูนิตต่อกรัมวัสดุแห้ง เมื่อวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสพบว่า ในวัสดุหมักที่เป็นฟางข้าวไอโซเลท FA68 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์

สูงที่สุดเมื่อเทียบกับวัดสุหมักอีก 4 ชนิด มีค่าเท่ากับ 17.53 ± 0.50 ยูนิตต่อกรัมวัสดุแห้ง ในขณะที่ไอโซเลท FA50 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูโลสรองลงมาจากเชื้อรา FA68 มีค่าเท่ากับ 0.22 ± 0.02 ยูนิตต่อกรัมวัสดุแห้ง ในวัสดุที่เป็นขังข้าวโพด แต่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซทานเนสสูงที่สุดเท่ากับ 18.17 ± 0.19 ยูนิตต่อกรัมวัสดุแห้งในวัสดุที่เป็นฟางข้าว นอกจากนี้ยังให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซทานเนสในปริมาณที่สูงกว่าจุลินทรีย์ไอโซเลทอื่น ในวัสดุที่เป็นขังข้าวโพด เศษใบไม้แห้งและกากปาล์มด้วย โดยมีค่าเท่ากับ 15.58 ± 0.74 , 10.55 ± 0.17 และ 9.82 ± 0.28 ยูนิตต่อกรัมวัสดุแห้งตามลำดับ

ผลการจัดจำแนกเชื้อในระดับสกุลพบว่าเชื้อรา FA50 และ FA68 คือ *Aspergillus* sp. และ *Aspergillus* sp. ตามลำดับ แบคทีเรีย BA118 จัดอยู่ในสกุล *Bacillus* sp. และแอคติโนมัยซิส AA15 จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* sp.

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ทั้ง 4 ไอโซเลท โดยแบคทีเรีย ออกแบบการทดลองโดยใช้พื้นที่ผิวการตอบสนอง (RSM) โดยมีตัวแปร (variable) ที่เลือกศึกษา และมีอิทธิพลต่อการผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียจำนวน 3 ตัวแปรคือ ค่าพีเอชเริ่มต้น อุณหภูมิและอัตราการเขย่า วางแผนการทดลองแบบ CCD ศึกษาการเจริญของเซลล์โดยพิจารณาจากค่าความขุ่นของเซลล์แบคทีเรีย BA 118 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS เพื่อหาความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง ค่าพีเอชเริ่มต้น อุณหภูมิและอัตราการเขย่า และสร้างสมการด้วยโปรแกรม statistica เวอร์ชัน 5.0 เพื่อทำนายค่าตอบสนอง ผลการศึกษาพบว่าจุดที่ให้ผลการตอบสนองสูงสุดคือที่อุณหภูมิ 36.58 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 6.63 ความเร็วรอบ 194.74 รอบต่อนาที นำสภาวะดังกล่าวมาศึกษาระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมพบว่าที่ 16 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อมีอัตราการเจริญสูงที่สุด มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of Determination : R^2) เท่ากับ 0.932 และค่า Coefficient of determination (adj. R^2) เท่ากับ 0.845 ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าค่าพีเอชเริ่มต้น อุณหภูมิและอัตราการเขย่ามีผลต่อการเจริญของ *Bacillus* sp. BA118

สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* ทั้ง 2 ไอโซเลทคือ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80 โดย *Aspergillus* sp. FA50 มีปริมาณสปอร์สูงที่สุดในวันที่ 5 เท่ากับ 9.46 log สปอร์ต่อกรัมเมล็ดข้าวฟ่าง คิดเป็น 1.56 เท่าของปริมาณเชื้อเริ่มต้น ส่วน *Aspergillus* sp. FA68 มีปริมาณสปอร์สูงที่สุดในวันที่ 6 เท่ากับ 10.27 log สปอร์ต่อกรัมเมล็ดข้าวฟ่าง คิดเป็น 1.64 เท่าของปริมาณเชื้อเริ่มต้น

สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Streptomyces* sp. AA15 คือที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 100 เมื่อเลี้ยงเชื้อที่สภาวะดังกล่าวพบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตและมี ปริมาณเซลล์สูงที่สุด เท่ากับ 7.41 log CFUต่อกรัมเมล็ดข้าวฟ่าง ในวันที่ 7 คิดเป็น 1.38 เท่าของปริมาณเชื้อเริ่มต้น

ข้อเสนอแนะ

ถึงแม้ว่างานวิจัยฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์จากธรรมชาติที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซทานเนสเพื่อที่จะนำไปประยุกต์ใช้เป็นหัวเชื้อเร่งปุ๋ยหมักในอนาคต แต่สำหรับผลการทดลองที่ได้สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดในด้านอื่น ๆ ได้ เช่น นำไปพัฒนาเพื่อเป็นหัวเชื้อที่มีประสิทธิภาพเพื่อผลิตเอนไซม์บริสุทธิ์ เนื่องจากประโยชน์ที่มีอย่างกว้างขวางของเอนไซม์ในกลุ่มนี้มีการนำไปใช้อย่างกว้างขวางในระดับอุตสาหกรรม หากแต่ต้องเพิ่มเติมในส่วนของการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ชนิดนั้น ๆ โดยสามารถออกแบบการทดลองโดยใช้พื้นที่ผิวการตอบสนอง (RSM) มาประยุกต์เพื่อหาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ สำหรับข้อมูลในงานวิจัยฉบับนี้อาจเป็นได้เพียงฐานข้อมูลความสามารถในการผลิตเอนไซม์เพียง 2 กลุ่มคือ เซลลูเลส และไซทานเนส ที่ได้จากจุลินทรีย์ 4 ชนิดที่ถูกคัดเลือก และทดลองแล้วว่าสามารถผลิตเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดได้ในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร โดยเฉพาะในวัสดุหมักที่เป็นฟางข้าวและซังข้าวโพด ซึ่งเป็นวัสดุที่มีปริมาณมากในประเทศไทยเพราะเป็นพืชเศรษฐกิจ นอกจากนี้การศึกษาในเรื่องของการใช้เชื้อผสมก็เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สามารถศึกษาต่อไปได้เพื่อพัฒนาเป็นหัวเชื้อผสมที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซทานเนสเพื่อเพิ่มผลผลิตและยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรของประเทศด้วย

อย่างไรก็ตามแม้ว่าแนวทางการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์จะมีอย่างกว้างขวางแต่ในเรื่องของความปลอดภัยก็ควรมีการศึกษาควบคู่ไปด้วยว่าจุลินทรีย์ที่นำไปใช้มีการผลิตสารพิษที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อมหรือไม่

บรรณานุกรม

- กรมพัฒนาที่ดิน. 2545. การจัดการดินและพืชเพื่อปรับปรุงดินอินทรีย์วัตถุต่ำ. กรุงเทพฯ : กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- จรรย์ ประจันบาล, สุรางค์ สุทธิราช และ วิเชียร กิจปรีชาวนิช. 2551. “สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ β -glucanase โดย *Aspergillus terreus* ASKU10 ในการหมักแบบแห้งด้วยวิธีพื้นผิวดอบสนอง.” หน้า 120-127. ใน เรื่องเติมการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- จันทร์จิรา อยู่คง. 2546. “การปรับปรุงผลผลิตของกระบวนการหมักสปอร์ของ *Bacillus subtilis* TISTR 001 เพื่อเป็นโพรไบโอติก.” วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- จิตตเสน อรุณศรี. 2529. “การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อราที่เจริญที่อุณหภูมิสูง.” วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- จุฑาธัญ คุรุชิตกานันท์. 2544. “การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียทนความร้อนที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ธงชัย มาลา. 2544. การผลิตปุ๋ยน้ำหมัก. ใน เอกสารเผยแพร่ลำดับที่ 73. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ธงชัย มาลา. 2550. ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ : เทคนิคการผลิตและการใช้ประโยชน์. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ธงชัย มาลา และ อรรถศิษฐ์ วงศ์มณีโรจน์. 2541. “การปรับปรุงบำรุงดินโดยใช้ปุ๋ยหมัก.” เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการ. นครปฐม : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน.
- นภา โล่ห์ทอง, อัญชริดา สวาจร, วิเชียร สีสุข และวิเชียร กิจปรีชาวนิช. 2535. “การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสและไซแลนจากวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมโดยเชื้อ *Aspergillus fumigatus* Fresenius. วิทยาสารเกษตรศาสตร์. 296-306.
- น้อย เกษมสุขสกุล. 2529. “การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อราที่ชอบอุณหภูมิสูงบนวัสดุที่เป็นของแข็ง.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาอุตสาหกรรมเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ปรีชา เกียรติกระจาย และ ทรงกลด จารุสมบัติ. 2528. เคมิซของเนื้อไม้. ภาควิชาวนผลิตภัณฑ์ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- ไพโรจน์ วิริยจารี. 2544. การออกแบบพื้นที่การตอบสนอง : Response Surface Design. เชียงใหม่ : คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ภาวนา ลิกขนานนท์, วิทยา ธานุสนธิ์ และ สุปราณี มั่นหมาย. 2549. “ผลิตภัณฑ์หัวเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์ทำปุ๋ยหมัก ปุ๋ยอินทรีย์น้ำและปุ๋ยอินทรีย์น้ำหมัก.” [แผ่นพับ]. กรุงเทพฯ : สำนักวิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- มณฑนพรพรข สงพิมพ์, พิลาณี ไวดนอมศักดิ์, บุญบา ยงสมิทธิ์ และ สาวิตรี จันทรานุรักษ์. 2551. “การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ pectate lyase จากเชื้อ *Paenibacillus polymyxa* N10 ในการหมักแบบอาหารเหลวโดยวิธีพื้นผิวดอกตอบสนอง.” 621-629. ใน เรื่องเติมการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- วรรณลดา สุนันทพงษ์ศักดิ์. 2545. เกษตรอินทรีย์ในประเทศไทย. กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- วรรณลดา สุนันทพงษ์ศักดิ์ และ ฉวีวรรณ เหลืองวุฒิวโรจน์. 2540. “การผลิตปุ๋ยหมักแบบไร่นา.” 14-28. ใน คู่มือเจ้าหน้าที่ของรัฐ เรื่อง การปรับปรุงบำรุงดินด้วยอินทรีย์วัตถุ. กรุงเทพฯ : กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- วราวุฒิ ครุสง . 2529. เทคโนโลยีชีวภาพ . กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.
- วิสาข์ ลิปัญญา. 2545. “การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่อุณหภูมิสูง.” ปรินญาณิพนธ์ วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- วิเชียร กิจปรีชาวนิช, วิเชียร สีสุข, อัญชริดา สวาขร และ นภา โล่ทอง. 2535. “การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสและไซแลนจากวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรม โดยเชื้อ *Aspergillus fumigatus* Fresenius รหัส 4-45-IE.” วารสารเกษตรศาสตร์. 26 : 296-306.
- วีรเทพ เฉลิมสมิทธิ์ชัย. 2550. “การศึกษาปริมาณธาตุที่เหมาะสมในอุตสาหกรรมการผลิตเหล็กดิบโดยวิธีการออกแบบการทดลอง.” วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมอุตสาหกรรม บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ
- สมภพ สุวรรณรัฐ. 2529. เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Aspergillus fumigatus*, *Myceliophthora thermophila* และ *Trichoderma viride* บนอาหารแข็ง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาการสอนเคมี บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- สมศักดิ์ วังใน. 2521. ปุ๋ยอินทรีย์. กรุงเทพฯ : สมาคมส่งเสริมเทคโนโลยี (ไทย-ญี่ปุ่น).

- เสียงแจ้ว พิริยพจนต์ และ นวลจันทร์ ภาสดา. 2540. “ปัจจัยที่ควบคุมอัตราการย่อยสลายในกองปุ๋ยหมัก.” 46-58. ใน **คู่มือเจ้าหน้าที่ของรัฐ เรื่อง การปรับปรุงบำรุงดินด้วยอินทรีย์วัตถุ.** กรุงเทพฯ : กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- เสียงแจ้ว พิริยพจนต์ และ พิทยากร ลิ้มทอง. 2537. “จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายและประโยชน์บางประการของการกองปุ๋ยหมัก.” 48-54. ใน **การปรับปรุงดินด้วยอินทรีย์วัตถุ.** กรุงเทพฯ : กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- ศิริชัย พงษ์วิชัย. 2548. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยคอมพิวเตอร์. 15. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Adams, T.T., Eiteman, M.A. and Adang, M.J. 1999. “*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* spore production in batch culture using broiler litter extracts as complex media.” **Biores. Technol.** 67 : 83-87.
- Ahmad, A. L., Ismail, S. and Bhatia, S. 2005. “Optimization of coagulation-flocculation process or palm oil mill effluent using response surface methodology.” **Environ. Sci. Technol.** 39 : 2828-2834.
- ✓ Ajay, P.N., Priya M. and Trevor, W.S. 2007. “The effect of carbohydrate carbon sources on the production of cellulase by *Phlebia gigantean*.” **Enz. Microb. Technol.** 40 : 1464-1468.
- Alexander, M. 1977. **Introduction to Soil Microbiology.** New York : John Wiley and Sons.
- Angel, M., Ruben, A., Nuria, S., Paula, Y. and Jesus, S. 2008. “Mycelium Differentiation and Antibiotic Production in Submerged Cultures of *Streptomyces coelicolor*.” **Appl. Environ. Microbiol.** 74 (12) : 3877-3886.
- AOAC. 2000. **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 17th ed. Association of Official Analytical Chemists. Inc. : Washington D.C.
- Araujo, A., Ward, O.W. 1990. “Extracellular mannanases and galactanases from selected fungi.” **J. Ind. Microbiol.** 6 : 171-178.
- Bayer, E.A. and Lamed, R. 1992. “The Cellulose Paradox : Pollutant par Excellence and/or a Reclaimable Natural Resource.” **Biodegradation.** 3 : 171-181.
- Beauchemin, K.A., Colombatto, D., Morgavi, D.P., Yang, W.Z. 2003. “Use of Exogenous Fibrolytic Enzymes to Improve Animal Feed Utilisation by Ruminants.” **J. Anim. Sci.** 81(2) : 37-47.
- Béguin, P. and Aubert, J. P. 1994. “The biological degradation of cellulose.” **FEMS. Microbiol. Rev.** 13 : 25-58.

- Beguin, P. 1990. "Molecular Biology of Cellulose Degradation." **Annu Rev Microbiol.** 44 : 219-248.
- Benitez, E., Nogales, R., Elvira, C., Masciandaro, G. and Ceccanti, B. 1999. "Enzyme Activities as Indicator of the Stabilization of Sewage Sludge Composting with *Eisenia foetida*." **Biores. Technol.** 67 : 297-303.
- Benito, M., Masaguer, A., Moliner, A., Arrigo, N. and Palma, R.S. 2003. "Chemical and microbiological parameters for the characterization of the stabilizing and maturing of pruning waste compost." **Biology and Fertility of Soils.** 37 : 184-189.
- Berner RA. 2003. "The Long Term Carbon Cycle, Fossil Fuels and Atmospheric Composition." **Nature.** 426 : 323-6.
- Biely, P. and Tenkanen, M. 1998. "Enzymology of Hemicellulose Degradation." 25-48. In : Harman, G. E. and Kubicek, C. P. (eds.). **Trichoderma and Gliocladium : Enzyme, biological control and commercial applications.** vol. 2. London : Taylor G Francis.
- Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C., and Lalitha, R. G. 2008. "Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease." **Biores. Technol.** 99 : 335-343.
- Bhat, M.K. 2000. "Research review paper : Cellulases and related enzymes in biotechnology." **Biotechnol. Adv.** 18 : 355-383.
- Bhat, M.K. and Bhat, S. 1997. "Cellulose degrading enzymes and their potential industrial application." **Biotechnol. Adv.** 15(3) : 583-620.
- Blanchette, R.A., Behrendt, C.D., Williams, D., Iverson, S., Akhtar, M. and Enebak, S.A. 1998. "A new approach to effective biopulping : treating logs with *Phlebiopsis gigantea*." In : **7th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry.**
- Bocchini, D.A., Alves-Prado, H.F., Baida, L.C., Roberto, I.C. and Gomes, E., 2002, "Optimization of Xylanase Production by *Bacillus circulans* D1 in Submerged Fermentation using Response Surface Methodology." **Process Biochem.** 38 : 727-731.
- Brown, R.M., Saxena, I.M. 2000. "Cellulose biosynthesis: A model for understanding the assembly of biopolymers." **Plant Physiol. Biochem.** 38 : 57-67
- Chahal, D.S. 1985. "Solid State Fermentation with *Trichoderma reesei* for Cellulase Production." **Appl. Environ. Microbiol.** 56 : 554-557.

- Chanikarn, K. 2005. "Selection of cellulase producing thermophilic fungi." 31st Congress on Science and Technology of Thailand 18-20 October 2005 at Technopolis, Nakornratchasima : Suranaree University of Technology.
- Charest, M.H., Antoun, H., Beauchamp, C.J. 2004. "Dynamics of Watersoluble Carbon Substances and Microbial Populations During the Composting of De-inking paper Sludge." **Biores. Technol.** 91 : 53-67.
- Collins, T., Gerday, C. and Feller, G. 2005. "Xylanases, Xylanase Families and Extremophilic Xylanases." **FEMS Microbiol. Rev.** 29 : 3-23.
- Cowling, E.B. 1975. "Physical and Chemical Constraints in the Hydrolysis of Cellulose and Lignocellulosic Materials." **Biotechnol. Bioeng. Symp.** 5 : 163-181.
- Cowling, E.B. and Kirk, T.K. 1976. "Properties of Cellulose and Lignocellulosic Materials as Substrates for Enzymatic Conversion Process." **Biotechnol. Bioeng.** 6 : 95-123.
- Coughlan, M.P. and Ljungdahl, L.G. 1988. "Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation." 11-30. In : Aubert, J. P., Beguin, P. and Millet, J. (eds.). **Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme systems.** vol. 43. London : Academic Press.
- Coutts, A.D. and Smith, R.E. 1976. "Factors Influencing the Production of Cellulases by *Sporotrichum thermophile*." **Appl. Env. Microbiol.** 31 (6) : 819-825.
- De Boer, W., Folman, L.B., Summerbell, R.C. and Boddy, L. 2005 "Living in a fungus word : impact of fungi on soil bacterial niche development." **FEMS Microbiol.Rev.** 29: 795-811
- Detroy, R. W. 1981. "Bioconversion of Agricultural Biomass to Organic Chemicals." 19-43. In : Goldstein, I. S. (ed.). **Organic chemicals from biomass.** Boca Raton : CRC Press.
- Eggins, H.O.W. and Pugh, G.J.F. 1962. "Isolation of Cellulose-decomposing Fungi from the Soil." **Nature.** 193 : 94-95.
- Enari, T.M. 1983. "Microbial cellulases." 83-223. In : Forgy, W.F. (ed.). **Microb. Enz. Biotechnol.** London : Applied Sciences publishers.
- Epstein, E. 1997. **The Science of Composting.** Lancaster, PA. : Technomic Pub.
- Falkowski, P., Scholes, R.J., Boyle, E., Canadell, J., Canfield, D., Elser, J. 2000. "The Global Carbon Cycle : A Test of our Knowledge of Earth as a System." **Science.** 290 : 291-6.

- Fan, L.T. and Lee, Y.H. 1983. "Kinetics Studies of Enzymatic Hydrolysis of Insoluble Cellulose : Derivation of a Mechanistic Kinetic Model." **Biotechnol. Bioeng.** 25 : 2707-2733.
- Fogarty, W.M. and Kelly, C.T. 1980. "Amylase, Amyloglucosidase and Related Glucanases." 115-170. In : Rose, A.H. (ed.). **Microbial Enzymes and Bioconversion.** vol. 5. New York : Academic Press.
- Fujio, Y. and Moo-young, M. 1980. "Isolation of Cellulolytic Fungi and some Properties of Isolated Fungi for Cellulose Biodegradation." **J. Gen. Appl. Microbiol.** 26 : 37-44.
- Ghose, T.K., Pathak, A.N., and Bisaria, V.S. 1975. "Proceedings of the Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose." 111-136. In : Bailey, M., Enari, T.M. and Linko, M. (eds.). **The Finnish National Fund for Research and Development (SITRA).** Finland : Aulanko.
- Gianni, P., Dimitris, K., Basil, J. M. and Paul, C. 2003. "Production of Cellulolytic and Xylanolytic Enzymes by *Fusarium Oxysporum* Grown on Corn Stover in Solid State Fermentation." **Ind. Crops Prod.** 18 : 37-45
- Gilman, J.C. 1971. **A Manual of Soil Fungi.** vol. 2. Ames, Iowa : Iowa State College Press.
- Globe. 2006. **Soil Protocols.** [Online]. Available : <http://www.globe.gov/fsl/html/templ.cgi?measpage&lang=en&nav=1>.
- Goldstein, I.S. 1981. **Organics Chemicals From Biomass.** Florida : CRC Press.
- Gomes, J., Gomes, I.H., Kreiner, W. and Steiner, W. 1989. "Production of cellulases by wild strain of *Gliocladium virens* : optimization of the fermentation medium and partial characterization of the enzyme." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 31 : 601-608.
- Habib, O., Mohammad R.Z., Mostafa M. and Nosratollah Z. 2005. "Identification of over producer strain of endo- β -1,4-glucanase in *Aspergillus species* : Characterization of crude carboxymethyl cellulase." **Afr. J. Biotechnol.** 4 (1) : 26-30.
- Hankin, L. and Anagnostakis, L. 1975. "The use of solid media for detection of enzyme production by fungi". **Micrologia.** 67 : 597-607.
- Halliwell, G. and Griffin, M. 1973. "The nature and mode of action of the cellulolytic component C₁ of *Trichoderma koningii* on native cellulose." **J. Biochem.** 135 : 587-594.
- Hoitink, H.A.J. 1986. "Basis for the control of soilborne plant pathogens with composts." **Annu Rev. Phytopathol.** 24 : 93-114.

- Howard, R.L., Abotsi, E., Jansen van Rensburg, E.L. and Howard, S. 2003. "Lignocellulose Biotechnology: Issues of Bioconversion and Enzyme Production." **Afr. J. Biotechnol.** 2 (12) : 602-619.
- Jan, H.D. and Chen, K.S. 2003. "Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1." **World J. Microbiol Biotechnol.** 19 : 8-263.
- Jeffries, T.W. 1994. "Biodegradation of lignin and hemicelluloses." 233-277. In : Ratledge, C. (ed.). **Biochemistry of Microbial Degradation.** Kluwer : Dordrecht.
- Jianmin, G., Haibo, W., Daheng, Z., Mingxue, Y., Fangxia, G. and Yu, X. 2008. "Production and Characterization of Cellulolytic Enzymes from the Thermoacidophilic Fungal *Aspergillus terreus* M11 under Solid-State Cultivation of Corn Stover." **Biores. Technol.** 99 : 7623-7629.
- Júlio, X.H., Plinho, F.H. and Marco, A.Z.A. 2002. "Cellulase and xylanase productions by isolated amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-strste cultivation." **Braz. J. Microbiol.** 33 : 213-218.
- Kagliwal, L.D., Survase, S.A., Singhal , R.S. 2009. "A novel medium for the production of cephamycin C by *Nocardia lactamdurans* using solid-state fermentation." **Biores. Technol.** 100 : 2600-2606.
- Katz, M., Reese, E.T. 1968. "Procuction of glucose by enzymatic hydrolysis of cellulose." **Appl. Microbiol.** 16 : 419-420.
- Keskar, S.S. 1992. "Cellulase production by *Penicillium janthinellum*." **World J. Microbiol Biotecnol.** 8(5) : 534-535.
- Kim, J.H., Hosobuchi, M., Kishimoto, M., Seki, T. Yoshida, T., Taguchi, H. and Ryu, D.D.Y. 1985. "Cellulase production by a solid-strate culture system." **Biotech. Bioeng.** 27 : 1145-1150.
- Kim, W.C., D.Y. Lee, C.H. Lee and C.W. Kim. 2004. Optimization of narirutin extraction during washing step of the pectin production from citrus peels. **J. Food Eng.** 63: 191-197.
- Kirk, T.K. and Cullen, D. 1998. "Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi." 273-307. In : Young, R.A., Akhtar, M. (eds.). **Environmentally Friendly Technologies for The Pulp and Paper Industry.** John Wiley and Sons.
- Kirk, T.K. and Farrell, R.L. 1987. "Enzymatic combustion : the microbial degradation of lignin." **Annu Rev Microbiol.** 41 : 465-505.

- Klich, M. A. 2002. **Identification of Common *Aspergillus* Species**. 116. Utrecht, Netherlands : Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Krieg, N.R., Holt, J.G., Murray, R.G.E., Brenner, D.J., Moulder, J.W., Pfenning, N., Sneath, P.H.A. and Staley, J.T. 1984. **Bergey's Manual of Systematic Biology**. Baltimore : Williams and Wikins.
- Kubicek, C.P., Messner, R., Cruber, F., Mach, R.L. and Kubicek-Pranz, E.M. 1993. "The *Trichoderma* cellulase regulatory puzzle : from interior life of a secretory fungus." **Enz. Microb. Technol.** 15(2) : 90-99.
- Kubicek-Pranz, E. M., Gruber, F. and Kubicek, C.P. 1991. "Transformation of *Trichoderma reesei* with the cellobiohydrolase II gene as a means for obtaining strains with improved cellulose productivity and specific activity." **J. Biotechnol.** 20 : 83-94.
- Kulkarni, N., Shendye, A. and Rao, M. 1999. "Molecular and biotechnological aspects of xylanases." **FEMS Microbio. Rev.** 23 : 411-456.
- Laura, L. , Claudia, H., Victor, L.P. 2008. "Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the white-rot fungus *Trametes trogii* in solid-state fermentation using response surface methodology." **J. Biochem. Eng.** 39 : 207-214.
- Lechevalier, M.P. and Lechevalier, H.A. 1980. "The chemotaxonomy of actinomycetes." 227-291. In : Dietz, A. and Thayer, D.W. (eds.). **Actinomycete Taxonomy**. U.S.A. : John Wiley and Sons.
- Lee, J. 1997. "Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol." **J. Biotechnol.** 56 : 1-24.
- Lee, K.J. and Rho, Y.T., 1993. "Characteristics of spores formed by solid and submerged cultures of *Streptomyces albidoflavus* SMF301." **J. Gen. Microbiol.** 139 : 3131-3137.
- Lewin, M. and Goldstein, I.S. 1991. **Wood structure and composition**. New York : Dekker.
- Limtong, P., Vangnai, S., Sunanthapongsuk, V. and Piriyaaprin, S. 1990. "Isolation and selection of thermophilic cellulolytic microorganisms for compost production in Thailand." **Kasetsart J. (Nat. Sci.)**. 24 : 108-115.
- Maheshwari, R., Bharadwaj, G., Bhat, M.K. 2000. "Thermophilic fungi: their physiology and enzymes." **Microb. Mol. Biol. Rev.** 64 : 461-488.
- Malherbe, S., Cloete, T.E. 2002. "Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications." **Rev. Environ. Sci. Biotechnol.** 1 : 105-14.

- Mandels M., Andreotti R. and Roche, C. 1976. "Measurement of saccharifying cellulase." **J. Biotechnol. Bioeng. Symp.** : 21-33.
- Mandels, M. and Reese, E.T. 1960. "Induction of cellulase in fungi by cellobiose." **J. Bacteriol.** 79 : 816-826.
- Mandels, M. and Sternberg, D. 1976. "Recent advances in cellulase technology." **J. Ferment. Technol.** 54(4) : 267-286.
- Marchesini, A., Allievi, L., Comotti, E. and Ferrari, A. 1998. "Long-term effects of quality compost treatment on soil." **Plant Soil.** 106 : 253-261.
- McGinnis, G.D. and Shafizadeh, F. 1980. "Cellulose and Hemicellulose." 1-38. In : Casey, J.P. (ed.). **Pulp and paper : Chemistry and chemical technology.** 3 rd ed. John Willey & Son.
- McKendry, P. 2002. "Energy production from biomass: overview of biomass." **Bioresour Technol.** 83 : 37-430.
- Melillo, J.M., Steudler, P.A., Aber, J.D., Newkirk, K., Lux, H., Bowles, F.P. 2002. "Soil warming and carbon-cycle feedbacks to the climate system." **Science.** 298 : 6-2173.
- Mendoza, N.S. and Josan, L.M. 1986. "Isolation, selection and characterization of cellulose degrading fungi." **The Philippine J. Sci.** 115(1) : 31-41.
- Miller, G.L. 1959. "Use of dinitrosalicylic acid (DNS) for determination of reducing sugars." **Anal. Chem.** 31 : 426-428.
- Montenecourt, B.S. 1983. "*Trichoderma reesei* cellulase." **Trends Biotechnol.** 1(5) : 156-160.
- Montgomery, D.C. 1991. **Design and Analysis of Experiments.** 3th ed., U.S.A. : John Wiley & Sons.
- Mu, Y., Wang, G. and Yu, H.Q. 2006. Response surface methodological analysis on biohydrogen production by enriched anaerobic cultures. **Enzyme Microbial Technol.** 38 : 905-913.
- Myers, R.H. and Montgomery, D.C. 2002. **Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments.** 2nd ed. U.S.A. : John Wiley and Sons.
- Neviani, E., Boquien, C.Y., Monnet, V., Phan Thanh, L. and Gripon, J.C. 1989. "Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. cremoris AM2." **Appl. Environ. Microbiol.** 55 : 2308-2314.
- Nishio N., Kurisu, H. and Nagai, S. 1981. "Thermophillic cellulase production by *Talalomyces* sp. In solid state cultivation. " **J. Ferment. Technol.** 59 : 407-410.

- Novak, J., Florek, M., Kwiatek, W., Lekki, J., Chevallier, P. and Zieba, E. 2005. "Composite structure of wood cell in petrified wood." **Mater Sci. Eng.** 25 : 119-30.
- Okeke, B.C. and Paterson, A. 1992. "Simultaneous production and induction of the cellulolytic and xylanolytic enzymes in a *Streptomyces* sp." **World J. Microbiol. Biotechnol.** 8 : 483-487.
- Oso B.A. 1978. "The production of cellulases by *Talaromyces emersonii*." **Mycologia.** 70 : 577.
- Palaniswamy, K. 1998. "Biochemical and molecular analysis of the cellulose system of white-rot fungi : *Phiebia gigantean*." Ph. D. Thesis, Melbourne : Department of Applied Biology and Biotechnology, Royal Melbourne Institute of Technology University.
- Petterson, R. C. 1984. "The chemical composition of wood." 57-126. In : Wowell, R.M. (ed.). **The Chemistry of Solid Wood.** Washington, D. C. : American Chemical Society.
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J. De La Robia, T. and Martínez, J. 2002. "Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview." **Int Microbiol.** 5 : 53-63.
- Percival, Z.Y.H., Michael, E.H. and Jonathan R.M. 2006. "Outlook for cellulase improvement : Screening and selection strategies." **Biotechnol. Adv.** 24 : 452- 481.
- Poincelot, R. P. and Day, P. R. 1972. "Simple dye release assay for determining cellulolytic activity of fungi." **Appl. Microbiol.** 23 : 875-879.
- Prasertsan, P. and Oi, S. 1992. "Production of cellulolytic enzymes from fungi and use in the saccharification of palm cake and palm fiber." **World J. Microbiol. Biotechnol.** 8 : 536-538.
- Prasad, S. Singh, A., and Joshi, H.C. 2007. "Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues." **Resour Conserv Recy.** 50 : 1-39
- Ramnani, P. and Gupta, R. 2004. "Optimization of medium composition for keratinase production on feather by *Bacillus licheniformis* RG1 using statistical methods involving response surface methodology." **Biotechnol. Appl. Biochem.** 40 : 191-196.
- Raper, B.K. and Fennell, D.I. 1965. **The genus *Aspergillus*.** Baltimore : The Williams and Wilkins.
- Ratto, M., Poutanen, K., Viikari, L. 1992. "Production of xylanolytic enzymes by an alkali-tolerant *Bacillus circulans* strain." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 37 : 470-3.

- Roberto, V. 2000. "Response surface methods for high dimension structural design problems." Ph.D. Thesis Of University of Florida.
- Rose, J.C. and Bennett, A.B. 1999. "Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network
- Rowell, M.R. 1992. "Opportunities for lignocellulosic materials and composites." **Trends Plant Sci.** 4 : 176-183.
- Ruan, J.S. 1994. "Rapid isolation and identification of *Actinomycetes*." In : **UNESCO Southeast Asia Regional Training Workshop on Rapid Method Microbiology and biotechnology**. Kasetsart University, Bangkok. Thailand.
- Ryu, D.D.Y., Kim, C. and Mandels, M. 1984. "Competitive adsorption of cellulase components and its significance in a synergistic mechanism." **Biotechnol. Bioeng.** 26 : 488-496.
- Sasaki, T., Tanaka, T., Nanbu, N., Sato, Y. and Karnuma, E. 1979. "Correlation between X-ray diffraction measurements of cellulose crystalline structure and the susceptibility of microbial cellulase." **Biotech. Bioeng.** 21 : 1031-1042.
- Setlow, B., Cabrera.H.A., Cabrera, M.R.M., Setlow, P. 2004. "Identification of aryl-phospho-beta-D-glucosidases in *Bacillus subtilis*." **Arch Microbiol.** 181 : 7-60.
- Setlow, P. 2006. "Spore of *Bacillus subtilis* : their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals." **J. Appl. Microbiol.** 101 : 25-514.
- Sheehan, J. and Himmel, M. 1999. "Enzymes, energy and the environment : A strategic perspective on the U.S. Department of Energy's Research and Development Activities for Bioethanol. **Biotechnol. Progr.** 15 : 817-27
- Sherman, J.M. and Albus, W.R. 1923. "Physiological youth in bacteria." **J Bacteriol.** 8(2) : 127-139.
- Shirling, E.B. and Gottlieb, D. 1966. Methods of characterization of *Streptomyces* species. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 61 : 313-340.
- Shoham, Y., Lamed, R. and Bayer, E.A. 1999. "The Cellulosome concept as an efficient microbial strategy for the degradation of insoluble polysaccharides. **Trends Microbiol.** 7 : 275-281.
- Shweta, S., Anushree, M., Santosh, S. 2009. "Application of response surface methodology (RSM) for optimization of nutrient supplementation for Cr (VI) removal by *Aspergillus lentulus* AML05." **J. Hazard. Mater.** 164 : 1198-1204.

- Shu, M.N., Yoo, S.H. and Lee, H.G. 2006. "Antioxidation activity and structural stability of microencapsulated γ -oryzanol in heat-treated lards." **Food Chem.** article in press
- Sitton, O.C., Foutch, G.L., Book, N.L. and Gaddy, J.L. 1979. "Etanol from agricultural residues." **Chem. Eng. Process.** 75 : 52-57.
- Skopec, C.E., Himmel, M.E., Matthews, J.F., Brady, J.W. 2003. "Energetics for displacing a single chain from the surface of microcrystalline cellulose into the active site of *Acidothermus cellulolyticus* Cel5A." **Protein Eng.** 16 : 1005-15.
- Soltes, Ed. J. 1983. **Wood and agricultural residues.** New York : Academic Press.
- Spelhaug, S. and S. Harlander. 1989. "Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*." **J. Food Prot.** 52 : 856-862.
- Sridevi, R., Varma, A. 1990. "Production and characterisation of xylanase from *Bacillus thermoalkalophilus* grown on agricultural wastes." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 34 : 141-4.
- Strom, P.F. 1985. "Effect of temperature on bacterial species diversity in thermophilic solid-waste composting." **Appl. Environ. Microbiol.** 50 : 899-905.
- Sun, Y. and Cheng, J. 2002. "Hydrolysis of lignocellulosic material from ethanol production : A review." **Biores. Technol.** 83 : 1-11.
- Swaroop, R.D., Krishna, N. 2000. "Production of thermostable cellulase-free xylanase by *Clostridium absonum* CFR-702." **Process Biochem.** 36 : 355-362.
- Tanaka, M., Nakamura, H., Taniguchi, M., Morita, T., Matsuno, R. and Kamikubo, T. 1986. "Elucidation of adsorption processes of cellulases during hydrolysis of crystalline cellulose." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 23 : 263-268.
- ✓Teacher, R.M. and Wood, P.J. 1982. "Use of congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen." **Appl. Environ. Microbiol.** 43 : 777-780.
- Thompson, N.S. 1983. "Hemicellulose as a biomass resource." 101-119. In : Solters, E.J. (ed). **Wood and agricultural residues : Research on use for food, fuel and Chemical.** San Diego : Academic Press.
- Tomme, P., Warren, R.A.J. and Gilkes, N.R. 1995. **Cellulose Hydrolysis by Bacteria and Fungi.** Department of Microbiology and Immunology, University of British Columbia, Vancouver. Canada : British Columbia V6T1Z3.

- Tsao, G.T. and Chiang, L. 1983. "Cellulose and hemicellulose technology." 296-326. In : Smith, D.R.B. and Kristiansen, B. (eds.). **The Filamentous Fungi**. vol. 4. New York : John Wiley and Sons.
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A. and Itävaara, M. 2000. "Biodegradation of lignin in compost environment : a review." **Biores. Technol.** 72 : 169-183.
- Umikalsom, M.S., Ariff, A.B., Shamsuddin, Z.H., Tong, C.C., Hassan, M.A. and Karin, M.I.A. 1997. "Production of cellulase by a wild strain of *Chaetomium globosum* using delignified oil palm empty-fruit-bunch fiber as substrate. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 47 : 590-595.
- Waksman, S.A., Umbreit, W.W. and Cordon, T.C. 1939. "Thermophilic actinomycetes and fungi in soils and in composts." **Soil Sci.** 47 : 37-61.
- Waldrop, M.P. and Firestone, M.K. 2004. "Microbial community utilization of recalcitrant and simple carbon compounds : impact of oak-woodland plant communities." **Oecologia.** 138 (2) : 275-284.
- Williams, S. T. and T. Cross. 1971. **Actinomycetes Methods Microbiol.** vol. 4 : 295-334.
- William, S.T., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. 1989. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. vol. 4. Baltimore : Williams and Wikins.
- West, E.S., Tod, W.R., Mason, H.S. and van Bruggen, J.T. 1968. **Text Book of Biochemistry**. vol. 4. 224-225. New York : The Macmillan.
- Wong, K.K.Y. and Saddler, J.N. 1992. "Applications of Hemicellulases in The Food, Feed and Pulp and Paper Industries." 127-143. In : Coughlan, P.P. and Hazlewood, G.P. (eds.). **Hemicellulose and Hemicellulases**. London : Portland Press.
- Wood, T.M. and Wilson, C.A. 1984. "Some properties of the endo-(1,4)- β -D-glucanase synthesized by the anaerobic cellulolytic rumen bacterium *Ruminococcus albus*. *Can.*". **J. Microbiol.** 30 : 316-321.
- Wood, T.M. and Bhat, K.M. 1988. "Methods for measuring cellulase activities." **Methods Enzymol.** 160 : 87-117.
- Wu, C.F.J. and Hamada, M. 2000. **Experiments : Planning, Analysis and Parameter Design Optimization**. New York : John Wiley and Sons.

Yang, S.Q., Yan, Q.J., Jiang, Z.Q., Li, L.T., Tian, H.M. and Wang, Y.Z. 2006. "High-level of xylanase production by the thermophilic *Paecilomyces thermophila* J18 on wheat straw in solid-state fermentation." **Biores. Technol.** 97 : 1794-1800.

Zhu, Y. S., Y. Q. Wu, W. Chen, C. Tan, J. H. Gao, J. X. Fei and C. N. Shih. 1982. Induction and regulation of cellulase synthesis in *Trichoderma pseudokoningii* mutant EA3-867 and N2-78. **Enzyme Microb. Technol.** 4 : 3-12.

[Online]. Available : <http://www.science.siu.edu/microbiology/micr302/figure%2010.05.jpg>

[Online]. Available : http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/Thumb/e/ee/Lignin_structure.svg.

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

1. อาหารแข็งคาร์บอกซีเมทิล เซลลูโลส (Carboxymethylcellulose agar, CMC) (ดัดแปลงจาก Hankin และ Anagnostakis, 1977)

เตรียม CMC โดยชั่งสารเคมีมาดังนี้

คาร์บอกซีเมทิล เซลลูโลส (CMC)	10.0	กรัม
แอมโมเนียม ซัลเฟต ((NH ₄) ₂ SO ₄)	1.0	กรัม
โพแทสเซียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต (KH ₂ PO ₄)	2.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (MgSO ₄ · 7 H ₂ O)	0.2	กรัม
ยีสต์สกัด	0.2	กรัม
วุ้น	15.0	กรัม

ละลายคาร์บอกซีเมทิล เซลลูโลส ในน้ำปริมาตร 500 มิลลิตร คนจะละลายจากนั้นเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.0 ± 0.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทลงในจานอาหารที่ฆ่าเชื้อแล้ว

2. อาหารแข็งแอลฟา เซลลูโลส (α cellulose agar)

การเตรียมอาหารแข็งแอลฟา เซลลูโลส ดัดแปลงจากอาหารแข็งคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส ซึ่งมีส่วนประกอบ เช่นเดียวกัน แต่เปลี่ยนจากคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสเป็นแอลฟาเซลลูโลส

3. อาหารเหลวแอลฟา เซลลูโลส (α cellulose broth)

การเตรียมอาหารแข็งแอลฟา เซลลูโลส ดัดแปลงจากอาหารแข็งคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส ซึ่งมีส่วนประกอบ เช่นเดียวกัน แต่ไม่เติมวุ้น

4. อาหารแข็งพี ดี เอ (Potato Dextrose Agar, PDA) อาหารสำเร็จรูปของ Hi-media

ประกอบด้วย

อาหารแข็งพี ดี เอ	39.0	กรัม
-------------------	------	------

ละลายอาหารแข็งพี ดี เอ ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับพีเอชเป็น 5.6 ± 0.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทลงในจานอาหารที่ฆ่าเชื้อแล้ว

5. อาหารเหลวนิวเตรียนต์ (Nutrient broth, NB) อาหารสำเร็จรูปของ Hi-media ประกอบด้วย

อาหารเหลวนิวเตรียนต์ สำเร็จรูป	13.0	กรัม
--------------------------------	------	------

ละลายอาหารเหลวนิวเตรียนต์ สำเร็จรูป ลงในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.4 ± 0.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. อาหารแข็งนิวเตรียนต์ (Nutrient agar, NA)

ส่วนประกอบและวิธีเตรียมเหมือนกับอาหารเหลวนิวเตรียนต์ แต่ใส่วุ้น 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร

7. อาหารแข็ง Yeast malt extract agar (YM Agar) อาหารสำเร็จรูปของ Hi-media ประกอบด้วย

น้ำตาลเด็กโตส	10.0	กรัม
---------------	------	------

เบปโตน	5.0	กรัม
--------	-----	------

มอลต์สกัด	3.0	กรัม
-----------	-----	------

ยีสต์สกัด	3.0	กรัม
-----------	-----	------

วุ้น	15.0	กรัม
------	------	------

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.0 ± 0.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8. สารละลายเกลือแร่ (Daniel และคณะ. 2007)

ประกอบด้วย

ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4)	5.0	กรัม
-----------------------------------	-----	------

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	5.0	กรัม
---	-----	------

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.1	กรัม
--	-----	------

แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	0.025	กรัม
------------------------------	-------	------

ซิงค์ซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.01	กรัม
--	------	------

แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$)	0.01	กรัม
-----------------------------	------	------

หมายเหตุ

ค่าพีเอชเริ่มต้นของสารละลายปรับตามชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ โดยเชื้อรา ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 5.6 ± 0.2

เชื้อแบคทีเรีย ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 7.0 ± 0.2

เชื้อแอคติโนมัยซิส ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 7.0 ± 0.2 (Rifaat และคณะ. 2005)

9. อาหารแข็งสำหรับผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์

ประกอบด้วย

ข้าวฟ่าง	10.0	กรัม
----------	------	------

ชั่งข้าวฟ่างมา 10 กรัม ใส่ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับความชื้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายเกลือแร่ในข้อ 7 เขย่าให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

10. อาหารเหลวเอ็มอาร์ – วีพี (MR-VP broth)

ประกอบด้วย

เปปโตน	7.0	กรัม
--------	-----	------

กลูโคส	5.0	กรัม
--------	-----	------

ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (Dipotassium phosphate)	5.0	กรัม
--	-----	------

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับพีเอชเป็น 6.9 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

11. อาหารเหลวไนเตรต (Nitrate broth)

ประกอบด้วย

โพแทสเซียมไนเตรต (Potassium nitrate)	5.0	กรัม
--------------------------------------	-----	------

เปปโตน	5.0	กรัม
--------	-----	------

เนื้อสกัด	3.0	กรัม
-----------	-----	------

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

12. อาหารทริปโตน

ละลายทริปโตน (Tryptone) 10.0 กรัม ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.0 ± 0.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

13. อาหารทดสอบการย่อยแป้ง (Starch agar)

ประกอบด้วย

เนื้อสกัด (Beef extract)	3.0	กรัม
เปปโตน	5.0	กรัม
แป้งมันฝรั่ง (Potato starch)	10.0	กรัม
วุ้น	15.0	กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
วิธีการเตรียมสารเคมี

1. สารละลายแบร์ริตรีเอเจนต์

ประกอบด้วย สารละลาย A และสารละลาย B มีวิธีการเตรียม ดังนี้

สารละลาย A

ละลายแอลฟา-แนปทอล (α naphthol) 5.0 กรัม ในเอทานอล (Ethanol) 100 มิลลิลิตร

สารละลาย B

ละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium hydroxide) 16.0 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

2 โครแมครีเอเจนต์

ประกอบด้วย

พารา-ไดเมทิลอะมิโนเบนซอลดีไฮด์ (p-dimethylaminobenzaldehyde) 5.0 กรัม

บิวทิล แอลกอฮอล์ (Butyl alcohol) 75.0 มิลลิลิตร

กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Hydrochloric acid concentrated) 20.0 มิลลิลิตร

ละลายพารา-ไดเมทิลอะมิโนเบนซอลดีไฮด์ในบิวทิล แอลกอฮอล์ แล้วจึงเติมกรดไฮโดรคลอริก

3. แอซิก-แอลกอฮอล์

เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปริมาตร 3.0 มิลลิลิตรในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 97.0 มิลลิลิตร

4. สารละลายคองโก เรด (Congo red) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1

ประกอบด้วย

คองโก เรด 0.1 กรัม

น้ำกลั่น 100.0 มิลลิลิตร

ละลายคองโก เรด 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นคนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

5. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 1 โมลาร์

ประกอบด้วย

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	58.44	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 58.44 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นคนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

6. สารละลาย Dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller. 1995)

ประกอบด้วย (ร้อยละ) ในน้ำกลั่น

ไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS)	1.0
ฟีนอล (Phenol)	0.2
โซเดียมโพแทสเซียมทาเตรต (Sodium potassium tartrate)	20.0
โซเดียมซัลไฟต์ (Sodium sulfite)	0.05
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)	1.0

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในน้ำกลั่นตามปริมาณที่ต้องการ แล้วจึงเติมสารละลายอื่น ๆ ลงในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ บรรจุใส่ขวดสีชาแล้วเก็บไว้ในที่มืด

7. ซิเตรต บัฟเฟอร์ (Citrate buffer) ตามวิธีของ Lillie (อ้างโดย Stroll and Blanchard. 1990)

ประกอบด้วย สารละลาย A และสารละลาย B ดังนี้

สารละลาย A คือกรดซิตริก (citric acid) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

กรดซิตริก	21.01	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

สารละลาย B คือ สารละลายโซเดียมซิเตรต (Sodium citrate) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

โซเดียมซิเตรต ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$)	29.41	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ให้ได้ค่าพีเอชตามที่ต้องการ

A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	พีเอช
40.0	10.0	3.4
37.0	13.0	3.6
35.0	15.0	3.8
33.0	17.0	4.0
31.5	18.5	4.2
28.0	22.0	4.4
25.5	24.5	4.6
23.0	27.0	4.8
20.5	29.5	5.0
18.0	32.0	5.2
16.0	34.0	5.4
13.7	36.3	5.6
11.8	38.2	5.8
9.5	41.5	6.0

ภาคผนวก ค

วิธีทดสอบและการวิเคราะห์

1. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณความชื้นของดินโดยวิธีชั่งน้ำหนัก (Globe, 2006)

1.1 อบถั่วยกระเบื้องขนาดบรรจุประมาณ 500 กรัม ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปใส่ในโถดูดความชื้น รอจนถั่วยมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนักด้วย ปลายด้วยเครื่องชั่งความละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง บันทึกลงในแบบบันทึกส่วนการตรวจวิเคราะห์ ตามแบบบันทึกการตรวจวิเคราะห์ปริมาณความชื้นของดิน โดยวิธีชั่งน้ำหนัก

1.2 ชั่งน้ำหนักดินเปียกและถั่วยด้วยเครื่องชั่งความละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง ประมาณ 100 กรัม บันทึกลงในแบบบันทึกส่วนการตรวจวิเคราะห์ความหนาแน่นรวมตามแบบบันทึกการตรวจวิเคราะห์ความหนาแน่นและความพรุนของดิน

1.3 อบดินเปียกและถั่วยที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปใส่ ในโถดูดความชื้น รอจนถั่วยมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนักดินแห้งและถั่วยด้วยเครื่องชั่ง ความละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง บันทึกลงในแบบบันทึกส่วนการตรวจวิเคราะห์ตามแบบบันทึก การตรวจวิเคราะห์ปริมาณความชื้นของดิน โดยวิธีชั่งน้ำหนัก

1.4 ตรวจวิเคราะห์ปริมาณความชื้นของดินโดยวิธีชั่งน้ำหนักซ้ำตามข้อ 1.1 – 1.3 ทุกตัวอย่าง

1.5 คำนวณปริมาณความชื้นของดินจากสมการ

$$\text{ร้อยละของปริมาณความชื้นของดินโดยวิธีชั่งน้ำหนัก} = \frac{\text{น้ำหนักดินเปียกและถั่วย(กรัม)} - \text{น้ำหนักถั่วยเปล่า(กรัม)}}{\text{น้ำหนักดินแห้งและถั่วย(กรัม)} - \text{น้ำหนักถั่วยเปล่า(กรัม)}} \times 100$$

2. การวัดสีดิน

มีการกำหนดสีเป็นรหัสสี ซึ่งใช้รหัสสี Munsell ที่มีสีหลัก 5 สี คือ สีแดง : R(Red), เหลือง : Y (Yellow), เขียว G : (Green), น้ำเงิน B : (Blue) และม่วง P : (Purple) ประกอบด้วยเลข 3 ชุดของ Hue, Value และ Chroma

Hue คือ ค่าของสีหรือสีดั้งเดิม (primary color) ที่คนสามารถมองเห็นได้ เหมือนสีรุ้ง (rainbow color) ซึ่งสีของดินมีค่าผันแปรตั้งแต่ 10 R (สีแดง 100%) ถึง 5Y

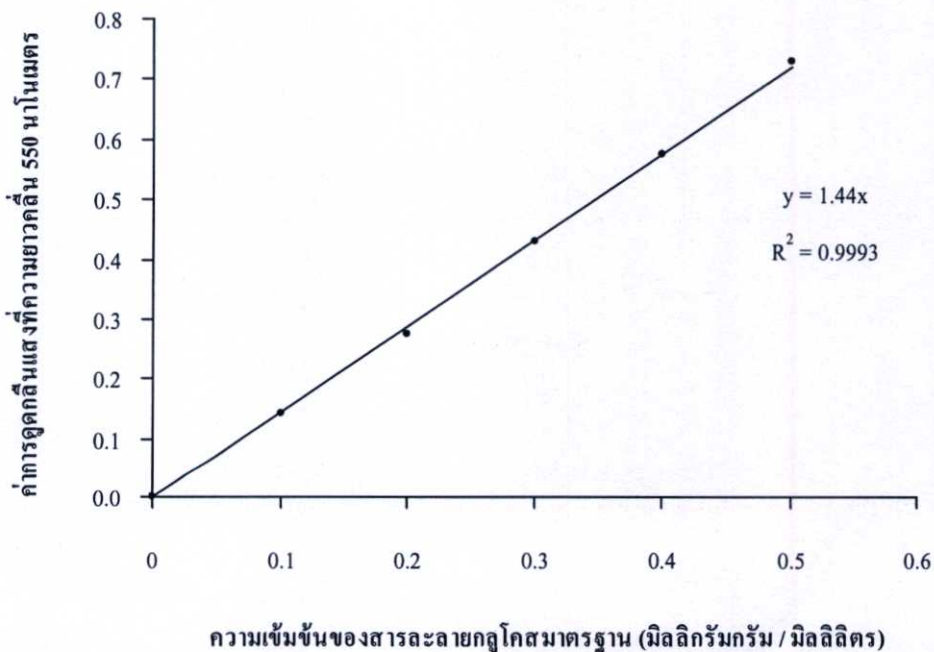
Value คือ ค่าความจางหรือความสว่างของสีผันแปรจากความจางต่ำ (ดำ) = 0 ถึงความจางสูง (ขาว) = 10

Chroma คือ ค่าความบริสุทธิ์ (purity) หรือความเข้มของสี (intensity) ของสีดั้งเดิม (Hue) ซึ่งสีของดินมีค่าผันแปรตั้งแต่ 0 - 8
การรายงานค่าสีต้องรายงานเป็น Hue, Value/Chroma เช่น 10YR5/3 ดังรูปที่ 2-4

3. การวิเคราะห์หน้าตาแร่ดินด้วยวิธี DNS ตามวิธีของ Miller (1959)

3.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาถลกลูโคส

1. ชั่งน้ำตาถลกลูโคส 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร
2. เจือจางให้ได้สารละลายน้ำตาถลกลูโคสที่มีความเข้มข้น 0.1 - 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
3. ปิเปตสารละลายน้ำตาถลกลูโคสจากข้อ 2 มาความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง (ใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตรเป็น bank)
4. เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 3 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที
5. ทำให้เย็นทันที และปรับปริมาตรให้ได้ 6 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น
6. เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร
7. นำข้อมูลไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาถลกลูโคส



รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานน้ำตาถลกลูโคส (มิลลิกรัม / มิลลิลิตร)

2.2 การคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

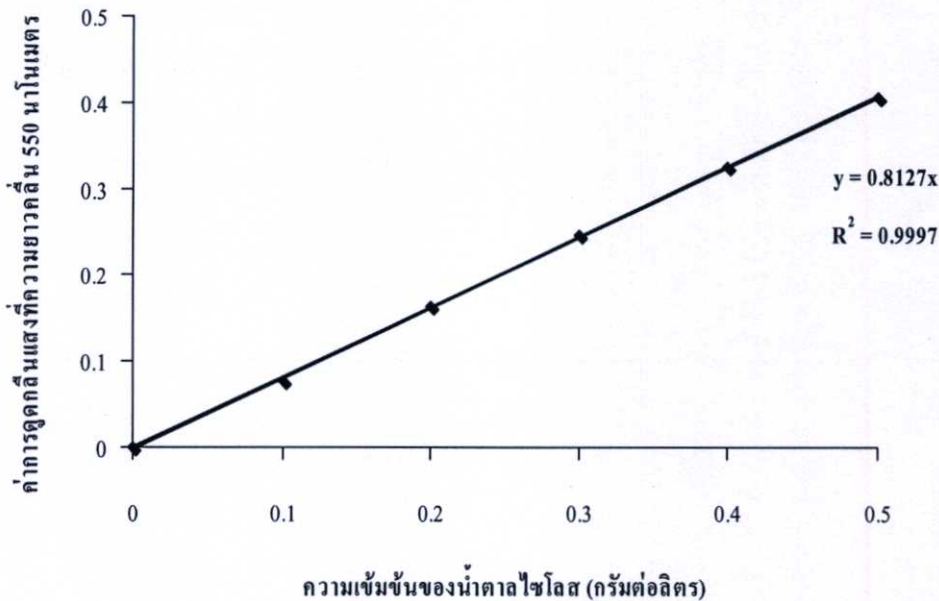
$$\frac{\text{ยูนิต / มิลลิลิตร}}{\text{ของอาหารเหลว}} = \frac{\text{มิลลิกรัมของกลูโคส} \times 1000 \times \text{จำนวนเท่าการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลกลูโคส} \times \text{ระยะเวลาการบ่ม} \times \text{ปริมาตรสารละลายเอนไซม์}}$$

$$\frac{\text{ยูนิต / กรัม}}{\text{ของอาหารแข็ง}} = \frac{\text{ยูนิต / มล.} \times (\text{ปริมาตรน้ำที่ใช้สกัดเอนไซม์} + \text{ปริมาตรน้ำที่เหลือจากการปรับความชื้น})}{\text{น้ำหนักของวัตถุดิบเริ่มต้น}}$$

4. การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสตามวิธีของ Deschatelets และ Yu (1986)

3.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซโลส

วิธีการเช่นเดียวกับการเตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสในข้อ 2.1 แต่เปลี่ยนจากน้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลไซโลส



รูปที่ 2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส (กรัม / ลิตร)

3.2 การคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส

$$\frac{\text{ยูนิต / มิลลิลิตร}}{\text{ของอาหารเหลว}} = \frac{\text{มิลลิกรัมของไซโลส} \times 1000 \times \text{จำนวนเท่าการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลไซโลส} \times \text{ระยะเวลาการบ่ม} \times \text{ปริมาตรสารละลายเอนไซม์}}$$

$$\frac{\text{ยูนิต / กรัม}}{\text{ของอาหารแข็ง}} = \frac{\text{ยูนิต / มล.} \times (\text{ปริมาตรน้ำที่ใช้สกัดเอนไซม์} + \text{ปริมาตรน้ำที่เหลือจากการปรับความชื้น})}{\text{น้ำหนักของวัตถุดิบเริ่มต้น}}$$

5. การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีของแบคทีเรีย

5.1 ทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility)

แทงเข็มเขี่ยเชื้อที่มีเชื้อแบคทีเรียลงหลอดทดลองที่มีอาหารแข็งนิวเตรียนต์ตรง ๆ เพียงครั้งเดียว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บันทึกลักษณะการเจริญ และการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย

5.2 ทดสอบความสามารถการย่อยเจลาติน (Gelatin hydrolysis)

แทงเข็มเขี่ยเชื้อที่มีเชื้อแบคทีเรียลงหลอดทดลองที่มีอาหารแข็งนิวเตรียนต์ เจลิตินตรง ๆ เพียงครั้ง เดียว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการทดลองโดยนำหลอดทดลองใส่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที บันทึกลักษณะการ เจริญ และการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย

5.3 ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์คะตะเลส (Catalase test)

ขีดเชื้อแบคทีเรียในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็งนิวเตรียนต์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เข็มเขี่ยเชื้อกลางโคโลนีของแบคทีเรียแต่ละบนสไลด์หยดไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้นร้อยละ 3 ลงบนรอยเชื้อสังเกตฟองก๊าซที่เกิดขึ้นและบันทึกผลการ ทดลองเป็นบวก

5.4 ทดสอบความสามารถในการหมักน้ำตาล (Sugar fermentation)

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียลงในหลอดทดลองที่มีน้ำตาลแต่ละชนิด ได้แก่ glucose broth, mannitol broth, xylose broth และ arabinose broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเซลล์แบคทีเรีย การเปลี่ยนสีและการเกิดฟองก๊าซในหลอดคักก๊าซ บันทึกผลการทดลอง

5.5 การทดสอบปฏิกิริยา Voges Proskauer (V-P reaction)

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียลงในหลอดอาหารเหลวเอ็มอาร์-วีพี (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เดิมแบร์รีตรีเอเจนต์ (ภาคผนวก ข) สารละลาย A ปริมาตร 0.6

มิลลิลิตร และสารละลาย B ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ตรวจสอบโดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเกิดสีส้มแดง

ผลบวก เกิดสีส้มแดง แสดงว่า มี acetoin เกิดขึ้นในอาหารที่เชื้อเจริญ

ผลลบ อาหารยังคงมีสีเหลืองแสดงว่าไม่มี acetoin เกิดขึ้น

5.6 การทดสอบปฏิกิริยาไนเตรดรีดักชัน (Nitrate reduction)

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียลงในหลอดทดลองซึ่งมีอาหารเหลวไนเตรด (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เติมสารละลายกรดซัลฟานิลิก (sulfanilic acid) ร้อยละ 0.8 ในกรด อะซิติก เข้มข้น 0.5 นอร์มอล ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร และสารละลายอัลฟา-แนฟทิลเอมีน (α -naphthylamine) ร้อยละ 5 ในกรดอะซิติก เข้มข้น 5.0 นอร์มอล ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอด ทดลอง สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของอาหาร ในกรณีที่ผลการทดสอบไม่เปลี่ยนแปลง ให้ทำการทดลอง ขั้นที่ 2 โดยเติมผงสังกะสี (zinc powder) สังเกตและบันทึกผลการทดลอง

5.7 การทดสอบอินโดล (Indole production)

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียลงในหลอดอาหารเหลวทริปโตน (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เติมสารละลายโคแควรีเอเจนต์ 3 หยด (ภาคผนวก ข) ลงในหลอดทดลอง เขย่าเบา ๆ สังเกตสีแดงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกผลการทดลอง

5.8 ทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเหลว NB บ่มที่อุณหภูมิ 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

5.9 ทดสอบความสามารถในการทนเกลือ

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเหลว NB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 7 น้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

6. การย้อมสีแกรม (Gram's stain)

หยดน้ำลงบนกระจกสไลด์ จากนั้นใช้ลูปเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์กระจายบนหยดน้ำ (smear) ทิ้งให้แห้ง ย้อมด้วยสารละลาย crystal violet เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น หยดสารละลายไอโอดีนทิ้งไว้ 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นหยดแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 พอให้สีของ crystal violet หลุดออก

แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นทันที จากนั้นหยดสารละลาย safranin O ทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่นทิ้งไว้
 หนึ่ง นำไปตรวจสอบการติดสีแกรม ลักษณะเซลล์ และการจัดเรียงตัวด้วยกล้องจุลทรรศน์

7. การย้อมสีสปอร์ (Spore stain)

1. วางตะแกรงสำหรับรองสไลด์ลงบนบีกเกอร์น้ำเดือดที่มีไอ
2. วางสไลด์ที่มีเชื้อแบคทีเรียลงบนตะแกรงและหยดสี malachite green ให้ท่วมรอย
 สเมียร์ ทิ้งไว้นาน 5 นาที พร้อมกับคอยเติมน้ำยาเพื่อป้องกันสีแห้ง
3. ใช้ปากคีบจับสไลด์ นำไปล้างเบา ๆ ด้วยน้ำก๊อก
4. ย้อมทับด้วยสีซาฟรานิน (safranin) นาน 1 นาที
5. ล้างออกด้วยน้ำ ปลดสไลด์ให้แห้งหรือซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู
6. ตรวจสอบผลจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

8. การตรวจนับสปอร์ของเชื้อราโดยการใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์

1. เตรียมสารละลายสปอร์ โดยนำสปอร์มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผสมสารละลายทวิน 80
2. ปิเปตสารละลายสปอร์ที่เตรียมไว้ลงในฮีมาไซโตมิเตอร์ (ที่ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์)
 คูณมา 1-2 หยด และหยดลงด้านข้างของแผ่น cover slip
3. ตรวจนับโดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า
4. นับจำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละช่องเล็ก หรือนับช่องใหญ่แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย โดยหาร
 ด้วย จำนวนช่องทั้งหมดที่ทำการนับและนำไปคูณด้วยค่า 4×10^6 จะได้ปริมาณสปอร์ต่อมิลลิลิตร

วิธีการคำนวณหาปริมาณสปอร์

$$\begin{aligned}
 & \text{พื้นที่ 1 ช่องเล็กในตารางใหญ่มีค่าเท่ากับ } 0.05 \times 0.05 = 0.0025 \text{ ตารางมิลลิเมตร} \\
 & \text{ความลึกระหว่าง cover slip และตาราง} = 0.1 \text{ มิลลิเมตร} \\
 & \text{ดังนั้นปริมาตร 1 ช่องเล็ก จะมีค่า } 0.0025 \times 0.1 = 0.00025 \text{ ลูกบาศก์เซนติเมตร} \\
 & \text{ปริมาตร } 0.00025 \text{ ลูกบาศก์เซนติเมตร มีจุลินทรีย์ } Z \text{ สปอร์} \\
 & \text{ปริมาตร } 1 \text{ ลูกบาศก์เซนติเมตร มีจุลินทรีย์} = \frac{Z \times 1000}{0.0025} \\
 & = Z \times 4 \times 10^6 \text{ สปอร์ต่อมิลลิลิตร}
 \end{aligned}$$

9. การทดสอบองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์แอกติโนไมซีต

9.1 วิเคราะห์ชนิดของกรดไดอะมิโนไพมิลิก (2,6-Diaminopimelic acid, DAP) ในผนังเซลล์ตามวิธีของ Ruan. (1994) และ Lechevalier และ Lechevalier. (1980)

การเตรียมเซลล์

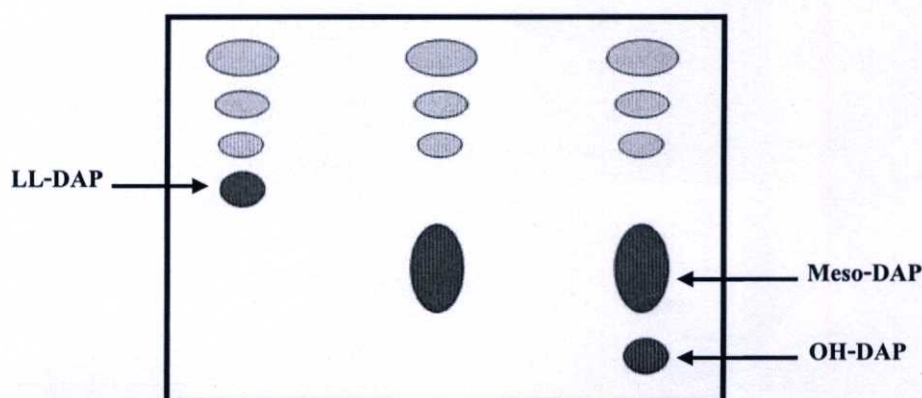
เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว YM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน บนเครื่องเขย่า (rotary shaker) เก็บเซลล์โดยการนำไปปั่นเหวี่ยง ใช้ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสข้างบนทิ้งไปแล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แช่เซลล์ในแอลกอฮอล์ ร้อยละ 95 ทิ้งไว้ 24 – 48 ชั่วโมง กรองเซลล์และผึ่งเซลล์ให้แห้งในโถดูดความชื้น เก็บไว้วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่อไป

การวิเคราะห์

ชั่งเซลล์ 0.01 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ใส่ลงในหลอดทดลองเติมกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 6 นอร์มัล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิดฝานำไปบ่มในภาชนะที่ 100 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง กรองเอากากเซลล์ทิ้งเก็บเอาสารละลายส่วนบนไว้ นำไประเหยแห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศ ที่ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมน้ำกลั่น 0.4 มิลลิลิตรเพื่อละลายตัวอย่างที่แห้ง นำสารละลายที่ได้ไปทำ Thin layer chromatography โดยใช้แผ่น TLC ใช้หลอดแคปิลารีดูดสารมาตรฐานของ 2,6 DAP ได้แก่ Meso-DAP และ LL-DAP ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กับสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้มาจุด (spot) ลงบนแผ่น TLC จากนั้นนำแผ่น TLC มาจุ่มลงในสารละลายผสมของ เมทานอล : น้ำ : กรดไฮโดรคลอริก 6 นอร์มัล : ไพรดีน ในอัตราส่วน 80 : 26 : 4 : 10 โดยปริมาตร ทิ้งไว้จนสารละลายเคลื่อนที่จนสุดแผ่น ตรวจสอบตำแหน่งของสาร โดยการพ่นด้วยสารละลายนินไฮดริน (ninhydrin) ร้อยละ 0.5 ในอะซีโตน (acetone) ฉีดพ่นสารให้ทั่วแผ่น TLC แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 5 นาที

การแปลผล

บริเวณที่ปรากฏแถบสีเป็นบริเวณของ DAP โดยเปรียบเทียบชนิดของ DAP ได้จากแถบสีของสารละลายมาตรฐาน ตำแหน่งของ DAP แสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 3 แสดงตำแหน่ง 2,6-Diaminopimelic acid, DAP

9.2 วิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโดยการย่อยสลายเซลล์ทั้งหมด

การเตรียมเซลล์

ชั่งเซลล์แห้งที่เตรียมจากข้อ 9.1 มา 0.05 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 16 x 100 มิลลิเมตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 นอร์มัล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิดฝานำไปต้มในถาดทรายที่ 100 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น ปรับพีเอชให้มีค่า 5.2 – 5.5 ด้วยสารละลายอิ่มตัวของ $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ตั้งทิ้งไว้ที่ 5 องศาเซลเซียส 1 คืน นำมาปั่นที่ 3,000 รอบ/นาที เพื่อแยกเอาตะกอนออกจากนั้นนำ ส่วนใสที่ได้มาเติมบิวทานอล 1 – 2 หยด นำไปประเหยแห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศ ที่ 42 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น 0.4 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปทำ Thin layer chromatography โดยใช้แผ่น TLC

การวิเคราะห์

นำสารละลายน้ำตาลมาตรฐานเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 มีน้ำตาลกาแลกโตส แมนโนส ไซโลส และ แรมโนส กลุ่มที่ 2 มีน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส และ ไรโบส กับสารละลายที่สกัดได้มาจุดลงบนแผ่น TLC เป่าให้แห้ง จากนั้นนำแผ่น TLC มาจุ่มลงในสารละลายผสมของ บิวทานอล : น้ำ : โพรพิลีน : โทลูอีน ในอัตราส่วน 10 : 6 : 6 : 1 ทิ้งไว้จนสารละลายเคลื่อนที่จนสุดแผ่น เป่าให้แห้ง ทำซ้ำอีกครั้ง แผ่น ตรวจสอบตำแหน่งของสารโดยการฉีดพ่นด้วยสารละลายผสม aniline phtalat ที่ประกอบด้วย phthalic acid 3.25 กรัม บิวทานอลที่อิ่มตัวด้วยน้ำ 100 มิลลิลิตร aniline 2 มิลลิลิตร ให้ทั่วแผ่นแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 5 – 10 นาที เปรียบเทียบชนิดของน้ำตาลจากสารตัวอย่างกับสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน โดยแถบสีของน้ำตาลจะมีสองแบบคือ แถบที่มีสีชมพูได้แก่ น้ำตาล ไรโบส (Rib), ไซโลส (Xyl) และอะราบิโนส (Ara) และแถบสีเหลืองได้แก่ น้ำตาล แรมโนส (Rham), แมนโนส (Man), กลูโคส (Glu) และ กาแลกโตส (Gal)

การรายงานผลรูปแบบของน้ำตาลภายในเซลล์ แบ่งเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

(Lechevalier. 1971)

Type A มีน้ำตาลอะราบิโนสและกาแลกโตส เป็นหลัก

Type B มีน้ำตาลมาดูโรส เป็นหลักซึ่งไม่มีในน้ำตาลมาตรฐานแต่จะอยู่บริเวณเดียวกับน้ำตาลไซโลสแต่จะมีสีเหลือง

Type C เป็นกลุ่มที่ไม่มีรูปแบบของน้ำตาลเฉพาะ

Type D มีน้ำตาลไซโลสเป็นหลัก

ภาคผนวก ง
ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ตารางที่ 1 ตารางเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราส่วนวงไตต่อโคโลนิของเชื้อราเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง CMC ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

Isolate	N	Subset for alpha = .05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
FA21	3	1.00							
FA23	3	1.01							
FA04	3	1.21							
FA10	3		1.80						
FA26	3		1.80						
FA02	3		2.00	2.00					
FA39	3			2.40	2.40				
FA05	3				2.60				
FA68	3				2.65				
FA18	3					4.00			
FA50	3						6.03		
FA40	3							7.66	
FA06	3							8.00	
FA61	3								10.26
Sig.		.339	.370	.063	.264	1.000	1.000	.118	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการศึกษาอัตราส่วนวงไตต่อโคโลนิของเชื้อรา

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	353.010	13	27.155	423.220	0.000
Within Groups	1.797	28	.064		
Total	354.806	41			

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยอัตราส่วนวงใสต่อโคโลนิของเชื้อแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง
CMC ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Isolate	N	Subset for alpha = .05														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
BA 38	3	1.000														
BA 62	3	1.070	1.070													
BA 57	3		1.100	1.100												
BA 59	3		1.113	1.113												
BA 58	3		1.120	1.120	1.120											
BA 86	3		1.120	1.120	1.120											
BA 2	3		1.140	1.140	1.140	1.140										
BA 117	3		1.146	1.146	1.146	1.146										
BA 39	3		1.153	1.153	1.153	1.153										
BA 61	3		1.160	1.160	1.160	1.160										
BA 138	3			1.170	1.170	1.170	1.170									
BA 48	3			1.173	1.173	1.173	1.173									
BA 84	3				1.210	1.210	1.210	1.210								
BA 114	3					1.223	1.223	1.223	1.223							
BA 60	3					1.230	1.230	1.230	1.230	1.230						
BA 56	3						1.260	1.260	1.260	1.260	1.260					
BA 79	3						1.260	1.260	1.260	1.260	1.260					
BA 41	3						1.263	1.263	1.263	1.263	1.263					
BA 74	3						1.263	1.263	1.263	1.263	1.263					
BA 6	3							1.290	1.290	1.290	1.290					
BA 15	3							1.290	1.290	1.290	1.290					
BA 71	3							1.290	1.290	1.290	1.290					
BA 78	3							1.290	1.290	1.290	1.290					
BA 83	3							1.290	1.290	1.290	1.290					
BA 158	3								1.310	1.310	1.310					
BA 170	3									1.323	1.323					
BA 72	3										1.330					
BA 8	3											1.430				
BA 100	3											1.430				
BA 167	3											1.430				
BA 98	3											1.433				
BA 118	3											1.453				
BA 77	3											1.480				
BA 36	3											1.496				
BA 95	3											1.500				
BA 47	3												2.000			
BA 137	3												2.000			
BA 40	3													2.140		
BA 140	3													2.140		
BA 44	3														2.240	
BA 14	3															2.440
Sig.		.092	.066	.140	.066	.066	.056	.111	.084	.062	.165	.152	1.000	1.000	1.000	1.000

ตารางที่ 4 แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราในอาหารเหลวที่มีแอลฟาเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ไอโซเลท	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (U/ml)			
	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7
FA05	0.00 ^c	0.01 ^d	0.04 ^{d,e}	0.04 ^d
FA06	0.03 ^b	0.03 ^c	0.07 ^c	0.05 ^c
FA18	0.03 ^b	0.03 ^c	0.04 ^{d,e}	0.04 ^d
FA39	0.03 ^{a,b}	0.03 ^c	0.04 ^{d,e}	0.04 ^d
FA40	0.01 ^c	0.04 ^b	0.05 ^d	0.03 ^e
FA50	0.04 ^a	0.04 ^b	0.13 ^b	0.08 ^b
FA61	0.00 ^c	0.01 ^d	0.03 ^f	0.02 ^f
FA68	0.03 ^{a,b}	0.05 ^a	0.17 ^a	0.10 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแต่ละคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

ตารางที่ 5 แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแอกติโนมัยซิสในอาหารเหลวที่มีแอลฟาเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ไอโซเลท	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (U/ml)			
	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7
AA05	0.01	0.01	0.02	0.03
AA15	0.11	0.12	0.13	0.15
AA41	0.03	0.03	0.06	0.05
AA42	0.05	0.03	0.06	0.05
AA43	0.05	0.05	0.06	0.06
AA44	0.04	0.03	0.04	0.05

ตารางที่ 6 แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลวที่มีแอลฟา-เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ไอโซเลท	ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (U/ml)			
	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7
BA06	0.00 ^c	0.00 ^d	0.00 ^e	0.00 ^f
BA08	0.00 ^c	0.01 ^{b,c}	0.01 ^c	0.02 ^c
BA14	0.01 ^b	0.01 ^c	0.01 ^c	0.00 ^f
BA15	0.00 ^c	0.00 ^d	0.00 ^e	0.00 ^f
BA36	0.01 ^b	0.01 ^{b,c}	0.01 ^c	0.00 ^f
BA40	0.01 ^b	0.01 ^{b,c}	0.01 ^c	0.00 ^f
BA41	0.00 ^c	0.01 ^{b,c}	0.01 ^c	0.01 ^{d,e}
BA44	0.01 ^b	0.01 ^{b,c}	0.01 ^c	0.00 ^f
BA47	0.00 ^c	0.00 ^d	0.01 ^c	0.02 ^d
BA56	0.00 ^c	0.00 ^d	0.00 ^e	0.00 ^f
BA60	0.00 ^c	0.00 ^d	0.00 ^e	0.00 ^f
BA71	0.00 ^c	0.00 ^d	0.00 ^e	0.00 ^f
BA72	0.00 ^c	0.00 ^d	0.00 ^e	0.00 ^f
BA74	0.00 ^c	0.00 ^d	0.00 ^e	0.00 ^f
BA77	0.00 ^c	0.00 ^d	0.01 ^c	0.01 ^{d,e}
BA78	0.00 ^c	0.00 ^d	0.00 ^e	0.00 ^f
BA79	0.00 ^c	0.00 ^d	0.00 ^e	0.00 ^f
BA83	0.01 ^b	0.01 ^b	0.01 ^c	0.00 ^e
BA95	0.00 ^c	0.00 ^d	0.01 ^c	0.00 ^f
BA98	0.01 ^b	0.01 ^{b,c}	0.02 ^b	0.03 ^b
BA100	0.01 ^b	0.01 ^{b,c}	0.02 ^b	0.03 ^b
BA118	0.02 ^a	0.04 ^a	0.04 ^a	0.06 ^a
BA137	0.00 ^c	0.01 ^{b,c}	0.01 ^c	0.01 ^{d,e}
BA140	0.01 ^b	0.01 ^{b,c}	0.00 ^d	0.00 ^f
BA158	0.00 ^c	0.01 ^{b,c}	0.01 ^c	0.00 ^f
BA167	0.00 ^c	0.00 ^d	0.00 ^e	0.00 ^f
BA170	0.00 ^c	0.00 ^d	0.00 ^e	0.00 ^f

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแต่ละคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยการวิเคราะห์ด้วย DMRT

ตารางที่ 7 ค่าเฉลี่ยกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งของเชื้อรา FA50 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

วัสดุหมัก	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
กากกาแฟ	4	.0100			
กากปาล์ม	4	.0325			
ใบไม้แห้ง	4		.0650		
ฟางข้าว	4			.1125	
ซังข้าวโพด	4				.2200
Sig.		.103	1.000	1.000	1.000

ตารางที่ 8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการศึกษากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งของเชื้อรา FA50 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.111	4	.028	82.329	.000
Within Groups	.005	15	.000		
Total	.116	19			

ตารางที่ 9 ค่าเฉลี่ยกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งของเชื้อรา FA68 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

SUBSTRAT	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
กากปาล์ม	4	.0425		
กากกาแฟ	4		.0975	
ใบไม้แห้ง	4		.0975	
ซังข้าวโพด	4		.1000	
ฟางข้าว	4			.2350
Sig.		1.000	.745	1.000

ตารางที่ 10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการศึกษากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งของเชื้อรา FA68 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.082	4	.020	201.566	0.000
Within Groups	.002	15	.000		
Total	.083	19			

ตารางที่ 11 ค่าเฉลี่ยกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งของเชื้อแบคทีเรีย BA118 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

SUBSTRAT	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
ซังข้าวโพด	4	.0000		
กากกาแฟ	4	.0050	.0050	
ฟางข้าว	4		.0075	
ใบไม้แห้ง	4			.0225
กากปาล์ม	4			.0275
Sig.		.150	.459	.150

ตารางที่ 12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการศึกษากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งของเชื้อแบคทีเรีย BA118 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.002	4	.001	25.962	0.000
Within Groups	.000	15	.000		
Total	.003	19			

ตารางที่ 13 ค่าเฉลี่ยกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งของเชื้อแอกติโน-
มัยซิส AA15 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

SUBSTRAT	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
ฟางข้าว	4	.0000		
กากกาแฟ	4		.0125	
กากปาล์ม	4		.0175	
ใบไม้แห้ง	4		.0175	
ซังข้าวโพด	4			.1350
Sig.		1.000	.407	1.000

ตารางที่ 14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการศึกษากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสในสภาวะการ
หมักแบบอาหารแข็งของเชื้อแอกติโนมัยซิส AA15 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็น
เวลา 5 วัน

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.049	4	.012	199.986	0.000
Within Groups	.001	15	.000		
Total	.050	19			

ตารางที่ 15 ค่าเฉลี่ยกิจกรรมเอนไซม์ไซลาลเนสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งของเชื้อรา FA50
ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

SUBSTRAT	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
กากกาแฟ	4	.5850			
กากปาล์ม	4		9.8175		
ใบไม้แห้ง	4		10.2100		
ซังข้าวโพด	4			15.5800	
ฟางข้าว	4				18.1725
Sig.		1.000	.469	1.000	1.000

ตารางที่ 16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการศึกษากิจกรรมเอนไซม์ไซลันเนสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งของเชื้อรา FA50 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	731.341	4	182.835	328.052	.000
Within Groups	8.360	15	.557		
Total	739.701	19			

ตารางที่ 17 ค่าเฉลี่ยกิจกรรมเอนไซม์ไซลันเนสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งของเชื้อรา FA68 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

SUBSTRAT	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
กากปาล์ม	4	.9750				
กากกาแฟ	4		4.7700			
ใบไม้แห้ง	4			8.3725		
ซังข้าวโพด	4				10.3625	
ฟางข้าว	4					17.5300
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

ตารางที่ 18 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการศึกษากิจกรรมเอนไซม์ไซลันเนสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งของเชื้อรา FA68 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

Xylanase activity	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	622.066	4	155.517	292.675	0.000
Within Groups	7.970	15	.531		
Total	630.037	19			

ตารางที่ 19 ค่าเฉลี่ยกิจกรรมเอนไซม์ไซลาลเนสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งของเชื้อแบคทีเรีย BA118 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

SUBSTRAT	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
กากกาแฟ	4	.1350				
กากปาล์ม	4		.3350			
ซังข้าวโพด	4			.4200		
ฟางข้าว	4				.6425	
ใบไม้แห้ง	4					1.0275
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

ตารางที่ 20 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการศึกษากิจกรรมเอนไซม์ไซลาลเนสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งของเชื้อแบคทีเรีย BA118 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.859	4	.465	172.748	0.000
Within Groups	.040	15	.003		
Total	1.899	19			

ตารางที่ 21 ค่าเฉลี่ยกิจกรรมเอนไซม์ไซลาลเนสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งของเชื้อแอคติโนมัยซิส AA15 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

SUBSTRAT	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
ซังข้าวโพด	4	.0000				
ฟางข้าว	4		.3200			
กากกาแฟ	4			.7200		
กากปาล์ม	4				1.7700	
ใบไม้แห้ง	4					4.9975
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

ตารางที่ 22 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการศึกษากิจกรรมเอนไซม์ไลลาเนสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งของเชื้อแอสคิโนมัยซิส AA15 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	66.149	4	16.537	421.673	0.000
Within Groups	.588	15	.039		
Total	66.737	19			

ตารางที่ 23 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แบคทีเรีย BA118 ในอาหาร NB ที่อุณหภูมิ 36.6 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 6.63 อัตราเร็วในการเขย่า 195 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ชม. ที่	ค่า OD ที่ 600 nm.			ค่าเฉลี่ย	SD (±)
	1	2	3		
0	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00
3	0.08	0.07	0.08	0.08	0.00
6	0.543	0.559	0.54	0.55	0.01
9	1.306	1.35	1.297	1.32	0.02
12	1.81	1.738	1.884	1.81	0.04
15	1.959	1.945	1.945	1.95	0.00
16	2	1.979	2.063	2.01	0.03
18	1.945	1.941	1.923	1.94	0.01
21	1.704	1.713	1.773	1.73	0.02
24	1.409	1.503	1.503	1.47	0.03
27	1.441	1.44	1.432	1.44	0.00
30	1.273	1.305	1.276	1.28	0.01
33	1.163	1.18	1.173	1.17	0.00
35	1.134	1.16	1.117	1.14	0.01
36	0.989	0.985	0.999	0.99	0.00
39	0.869	0.916	0.926	0.90	0.02
42	0.806	0.836	0.826	0.82	0.01
45	0.9	0.9	0.9	0.90	0.00
48	0.8	0.885	0.81	0.83	0.03

ตารางที่ 24 แสดงจำนวนสปอร์ของเชื้อรา FA50 บนเมล็ดข้าวฟ่าง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80 เป็นเวลา 14 วัน

วันที่บ่ม	จำนวนสปอร์ (สปอร์/ กรัม)	SD (\pm)	จำนวนสปอร์ (log สปอร์ / กรัม)	SD (\pm)
0	1.2×10^6	2.0×10^4	6.08	0.0
2	8.8×10^7	5.1×10^6	7.94	0.0
4	2.6×10^8	5.0×10^7	8.39	0.1
5	3.0×10^9	5.5×10^8	9.46	0.1
6	1.7×10^9	1.7×10^8	9.23	0.0
8	1.7×10^9	1.3×10^8	9.21	0.0
10	3.0×10^8	6.0×10^6	8.48	0.0
12	1.6×10^8	2.9×10^7	8.2	0.1
14	1.8×10^8	2.3×10^7	8.24	0.1

ตารางที่ 25 แสดงจำนวนสปอร์ของเชื้อรา (log สปอร์ / กรัม) FA68 บนเมล็ดข้าวฟ่าง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80 เป็นเวลา 14 วัน

วันที่บ่ม	จำนวนสปอร์ (สปอร์/ กรัม)	SD (\pm)	จำนวนสปอร์ (log สปอร์ / กรัม)	SD (\pm)
0	1.2×10^6	2.0×10^4	6.26	0.02
2	8.8×10^7	5.1×10^6	7.71	0.04
4	2.6×10^8	5.0×10^7	9.48	0.03
5	3.0×10^9	5.5×10^8	9.6	0.03
6	1.7×10^9	1.7×10^8	10.27	0.03
8	1.7×10^9	1.3×10^8	10.13	0.02
10	3.0×10^9	6.0×10^6	10.13	0.02
12	1.6×10^9	2.9×10^7	9.17	0.05
14	1.8×10^9	2.3×10^7	9.16	0.02

ตารางที่ 26 แสดงจำนวนโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซิส AA15 บนเมล็ดข้าวฟ่าง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 100 เป็นเวลา 14 วัน

วันที่บ่ม	จำนวน โคโลนีต่อกรัม	SD (\pm)	จำนวน log โคโลนีต่อกรัม	SD (\pm)
0	2.4×10^5	1.6×10^4	5.38	0.03
2	5.6×10^5	3.1×10^4	5.75	0.03
4	8.4×10^6	3.2×10^5	6.93	0.01
6	1.1×10^7	6.0×10^6	7.03	0.02
7	2.6×10^7	1.3×10^6	7.41	0.02
8	2.5×10^7	1.8×10^6	7.39	0.03
10	1.4×10^7	1.0×10^6	7.15	0.03
12	1.3×10^7	2.9×10^6	7.11	0.01
14	1.2×10^7	1.2×10^6	7.06	0.01

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ — นามสกุล

นางสาวพิรุฬห์พร ศรีมงคล

วัน เดือน ปีเกิด

13 มกราคม 2525

ภูมิลำเนา

จังหวัดจันทบุรี

ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาโท

สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอม
เกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีที่เข้าศึกษา

2548

ปีที่จบการศึกษา

2551

วุฒิการศึกษา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ระดับปริญญาตรี

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี

จ.ปัตตานี คณะศึกษาศาสตร์ วิชาเอกชีววิทยา

สำเร็จการศึกษาเมื่อปีการศึกษา 2546

ปีที่เข้าศึกษา

2543

ปีที่จบการศึกษา

2546

วุฒิการศึกษา

วิทยาศาสตรบัณฑิต (ศึกษาศาสตร์)

วิชาเอก ชีววิทยา

วิชาโท เคมี

ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย

สำเร็จการศึกษาจากโรงเรียนศรียานุสรณ์ จันทบุรี

ระดับมัธยมศึกษาตอนต้น

สำเร็จการศึกษาจากโรงเรียนศรียานุสรณ์ จันทบุรี

ประวัติการทำงาน

พ.ศ. 2546-2574

เป็นอาจารย์ (อัตราจ้าง) ที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี
ราชมงคลตะวันออก (วิทยาเขตจันทบุรี) คณะ
ศึกษาทั่วไป ภาควิชา ชีววิทยา