การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากมูลวัว

ISOLATION OF CELLULASE PRODUCING BACTERIA FROM COW MANURE

นางสาวนันทนัท แสงพูพีรภัทร์
นางสาววรางคณา เวียงสิมา
นายศุภวิชญ์ ดาราดิกุล

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมีสิ่งแวดล้อม
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากมูลวัว

ISOLATION OF CELLILASE PRODUCING BACTERIA FROM COW MANURE

นางสาวนันทนัท แสงพูพีรภัทร์
นางสาววรางคณา เวียงสิมา
นายศุภวิชญ์ ดาราดิกุล

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 148961
วัน,เดือน,ปี 1 ธ.ค. 2560

b 12577200
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมีสิ่งแวดล้อม
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

ISOLATION OF CELLILASE PRODUCING BACTERIA FROM COW MANURE

MISS NANTANAT SANGPUPEERAPHAT

MISS WARANGKANA WIENGSIMA

MR. SUPHAVIT DARADIKUL

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN ENVIRONMENTAL RESOURCES CHEMISTRY

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2015

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากมูลวัว ISOLATION OF CELLULASE PRODUCING BACTERIA FROM COW MANURE
ชื่อนักศึกษา	นางสาวนันทนัท แสงพูพีรภัทร์ รหัสนักศึกษา 55050939 นางสาววรางคณา เวียงสิมา รหัสนักศึกษา 55050992 นายศุภวิชญ์ ดาราดิกุล รหัสนักศึกษา 55051011
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชา	เคมี
ปีการศึกษา	2558
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ประจำปีการศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ กรรมการ	
ดร.ศิริขวัญ พลประทีป กรรมการ	
ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากมูลวัว ISOLATION OF CELLULASE PRODUCING BACTERIA FROM COW MANURE
ชื่อนักศึกษา	นางสาวนันทนัท แสงพูพีรภัทร์ รหัสนักศึกษา 55050939 นางสาววรางคณา เวียงสิมา รหัสนักศึกษา 55050992 นายศุภวิชญ์ ดาราดิกุล รหัสนักศึกษา 55051011
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชา	เคมี
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2558
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากมูลวัว ตลอดจนทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลสที่สามารถสร้างได้โดยแบคทีเรียที่คัดเลือก เพื่อนำแบคทีเรียดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ทางด้านต่าง ๆ ในอุตสาหกรรม ทำการวิเคราะห์โดยเก็บตัวอย่างมูลวัวจากฟาร์มเลี้ยงสัตว์และวิจัย สัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงแข็ง NA ผสม CMC แล้วทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้โดยทำการศึกษาบริเวณโซนใสต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (HC) ผลการคัดแยกพบว่า สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากมูลวัวสูงสุดได้ 4 ชนิด โดยเชื้อหมายเลข 21 มีอัตราส่วนใสต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีกว้างที่สุดคือ 4.0 เซนติเมตร เมื่อทดสอบการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS reagent พบว่าเชื้อหมายเลข 16 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ดีที่สุดคือ 0.00431 U/ml และเมื่อทดสอบด้วยวิธี filter paper assay ผลที่ได้คือเชื้อหมาย 21 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ดีที่สุดคือ 0.00849 U/ml

Title	ISOLATION OF CELLULASE PRODUCING BACTERIA FROM COW MANURE
Students	MISS NANTANAT SANGPUPEERAPHAT 55050939
	MISS WARANGKANA WIENGSIMA 55050992
	MR. SUPHAVIT DARADIKUL 55051011
Degree	Bachelor of Science
Department	Chemistry
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2015
Advisor	Dr. Tipachai Vatanavicharn

Abstract

This research aims to select bacteria that can build cellulase enzymes from cow manure and to test efficiency of enzyme cellulase by selected bacteria to applications in various industries. We got and analyze the samples of cow manure from Farm animals and Research Bachelor of Science Program in Animal Science, King Mongkut's Institute of Technology Lat Krabang, Bangkok. Then growing bacteria in Nutrient agar (NA+CMC), Then select bacteria that can produce cellulase enzyme by studies the diameter of the clear zone around the colonies (HC).The bacterium No. 21 has the ratio clear the diameter of colonies width is 4.0 cm when testing the determination of reducing sugars by DNS reagent found that the bacteria No. 16 with the activity of the enzyme is best 0.00431 U / ml when tested with filter paper assay result is that 21 infected with the activity of the enzyme is best 0.00849 U / ml.

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ สาขาเคมีสิ่งแวดล้อม ซึ่งสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องด้วยความอนุเคราะห์จาก ดร.ธิปชัย วัฒวิจารณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำช่วยเหลือ ชี้แนะแนวทางในการทำโครงงานพิเศษตลอดจนตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของโครงงานพิเศษเล่มนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ ซึ่งทางคณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ได้ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือตลอดการทำโครงงานพิเศษในครั้งนี้เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณเพื่อนๆทุกคนที่ได้ให้ความช่วยเหลือและคอยเป็นกำลังใจให้ตลอดในยามที่มีปัญหาและยามที่ขาดกาลังใจ จนทำให้ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

นันทนัท แสงพูพีรภัทร์
วรางคณา เวียงสิมา
ศุภวิชญ์ ดาราดิกุล

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .....ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....ข
กิตติกรรมประกาศสารบัญ .....ค
สารบัญ .....ง
สารบัญตาราง .....ช
สารบัญรูป .....ซ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 เซลลูโลส (cellulose) 3

2.1.1 ชนิดของเซลลูโลส 3

2.1.2 การย่อยสลายเซลลูโลสทำได้ 2 วิธี 4

2.2 เซลลูเลส (Cellulase) 5

2.2.1 การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส 5

2.2.2 กลไกการสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลส 7

2.2.3 การวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส 9

2.2.4 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส 10

2.2.5 การนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ 12

2.3 มูลวัว 13

2.3.1 กระเพาะอาหาร ทั้ง 4 ส่วน 13

2.3.2 จุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน 14

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 17

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี 17

3.1.1 อุปกรณ์ 17

3.1.2 สารเคมี 17

3.2 วิธีดำเนินงานวิจัย 18

3.2.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย 18

3.2.2 การคัดเลือกและศึกษาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส 18

3.2.3 การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย 20

3.2.4 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส 20

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล 23

4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยเซลลูโลส 23

4.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส 23

4.3 การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย 28

4.4 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส 30

4.4.1 การทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธี DNS reagent 30

4.4.2 การทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธี filter paper assay 33

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 37

5.1 สรุปผลการวิจัย 37

5.2 ข้อเสนอแนะ 37

บรรณานุกรม.....38

ภาคผนวก.....41

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ.....42

ภาคผนวก ข วิธีการเตรียมสารเคมี.....43

ภาคผนวก ค การศึกษารูปร่างแบคทีเรียโดยการย้อมสี.....46

ภาคผนวก ง วิธีทดสอบและการวิเคราะห์.....47

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

2.1 ปฏิกิริยาการสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 7

2.2 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส 11

4.1 ลักษณะความกว้างวงใส 25

4.2 ผลการจัดกลุ่มจากการศึกษาลักษณะ 27

4.3 แสดงช่วงเวลาในการเจริญเติบโตของเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลท 28

4.4 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธี DNS reagent 31

4.5 ระยะเวลาที่ให้ประสิทธิภาพสูงที่สุดจากการทดสอบประสิทธิภาพด้วยวิธี DNS reagent 33

4.6 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธี filter paper assay 34

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปภาพที่

2.1 โครงสร้างของเซลลูโลส 3

2.2 ลักษณะการสานกันเป็นร่างแหของเซลลูโลส 3

2.3 โครงสร้างเอนไซม์เซลลูเลส 5

2.4 การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส 6

2.5 กลไกการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส 8

2.6 โครงสร้างกระเพาะวัว 14

3.1 การเจือจางด้วยเทคนิค serial dilution 19

3.2 เทคนิคการ spread plate และ streak plate 19

3.3 การวัดขนาดของวงใส หลังการย้อมสี Congo red 20

4.1 spread plate ตัวอย่างมูลวัว 23

4.2 ลักษณะการเกิดโซนใสรอบโคโลนี ของเชื้อหมายเลข 8 และ 10 24

4.3 ลักษณะการเกิดโซนใสรอบโคโลนี ของเชื้อหมายเลข 16 และ 21 24

4.4 แสดงลักษณะแกรม รูปร่าง ของเชื้อหมายเลข 8 26

4.5 แสดงลักษณะแกรม รูปร่าง ของเชื้อหมายเลข 10 26

4.6 แสดงลักษณะแกรม รูปร่าง ของเชื้อหมายเลข 16 27

4.7 แสดงลักษณะแกรม รูปร่าง ของเชื้อหมายเลข 21 27

4.8 การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 8 28

4.9 การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 10 29

4.10 การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 16 29

4.11 การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 21 30

4.12 การทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธี DNS reagent ของ แบคทีเรียหมายเลข 8 31

4.13 การทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธี DNS reagent ของ แบคทีเรียหมายเลข 10 32

4.14 การทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธี DNS reagent ของ แบคทีเรียหมายเลข 16 32

4.15 การทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธี DNS reagent ของ แบคทีเรียหมายเลข 21 33

4.16 ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธี filter paper assay 34

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เซลลูโลส (Cellulose) โดยส่วนใหญ่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเช่น ฟางข้าว ซังข้าวโพด (กระทรวงพลังงาน, 2555) และเป็นสารประกอบอินทรีย์ประเภทคาร์โบไฮเดรตที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของพืช เป็นหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคส (Glucose) ที่เชื่อมต่อเป็นสายยาวประกอบด้วยกลูโคสประมาณ 1,250-12,500 โมเลกุล สัตว์บางชนิดที่สามารถย่อยเซลลูโลสได้ เช่น สัตว์กินพืช โดยสัตว์จำพวกนี้จะอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์เป็นตัวช่วยในการย่อยเซลลูโลสจึงมีเอนไซม์จำเพาะที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ นั่นก็คือเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase enzyme) เอนไซม์เซลลูเลสเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่สร้างได้โดยสิ่งมีชีวิตทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย และรา เป็นต้น (klysov, 1990) จะถูกผลิตขึ้นมาเพื่อใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคส จุลินทรีย์แต่ละชนิดสร้างเอนไซม์เซลลูเลสที่มีความสามารถในการย่อยสลายแตกต่างกัน โดยขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมที่จุลินทรีย์เหล่านั้นเจริญอยู่ ส่วนใหญ่เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอกซ์ตราเซลลูลาร์เอนไซม์ (Extracellular enzyme) คือจะถูกสร้างและหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ ซึ่งจะถูกเหนี่ยวนำให้สร้างโดยสิ่งแวดล้อม เพราะเนื่องจากโมเลกุลของเซลลูโลสไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ได้ จุลินทรีย์จึงต้องขับเอนไซม์ออกสู่ภายนอกเซลล์เพื่อย่อยเซลลูโลสจนได้น้ำตาลที่ละลายน้ำได้ จากนั้นจึงจะดูดซึมน้ำตาลดังกล่าวเข้าสู่ภายในเซลล์เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนต่อไป (Alexander, 1967)

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมปัจจุบันการเลี้ยงสัตว์ภายในประเทศเจริญเติบโตและพัฒนาเป็นไปอย่างรวดเร็ว สัตว์ที่อยู่คู่กับเกษตรกรคนไทยมาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันนั่นก็คือวัว โดยส่วนใหญ่วัวจะกินอาหารจำพวกพืชหรือหญ้าเข้าไปซึ่งพืชและหญ้าเหล่านี้จะมีเซลลูโลสเป็นสารประกอบอินทรีย์หลัก (กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2547) ภายในระบบการย่อยอาหารของวัวจะมีแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายพืชที่มีสารประกอบเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักได้ แบคทีเรียที่สำคัญได้แก่ *Bacteroidessuccinogenes* และ*Ruminococcus spp.* (เทอดชัย, 2548

และเมธา, 2529) การนำแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสถูกนำมาใช้ประโยชน์มากที่สุด เพราะเนื่องจากแบคทีเรียเจริญได้ง่าย มีระยะเวลาในการแบ่งตัวที่สั้น อาหารเลี้ยงเชื้อมีราคาไม่แพง อีกทั้งยังสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดี (Mawadza et al., 2000) และในปัจจุบันได้มีการนำมาผลิตเพื่อการค้าโดยมีการผลิตอย่างแพร่หลายในระดับอุตสาหกรรม จากการใช้เอนไซม์เซลลูเลสดังกล่าวจึงได้มีการจัดทำโครงงานพิเศษเรื่อง การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากมูลวัว ซึ่งงานวิจัยนี้จะมุ่งเน้นในการคัดแยกแบคทีเรียที่ได้จากมูลวัวที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อนำเอนไซม์ดังกล่าวนี้ไปประยุกต์ใช้ทางด้านต่าง ๆ ในอุตสาหกรรม เช่น การผลิตกระดาษ เส้นใย อาหารสัตว์ รวมไปถึงการผลิตไบโอเอทานอล (Bhat, 2000) ซึ่งเป็นสิ่งที่น่าสนใจต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) คัดเลือกและศึกษาสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากมูลวัว

2) ทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างได้โดยแบคทีเรียที่คัดเลือก

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

คัดเลือกแบคทีเรียจากมูลวัวที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส และทำการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่สร้างได้จากมูลวัว

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ได้เชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากมูลวัว

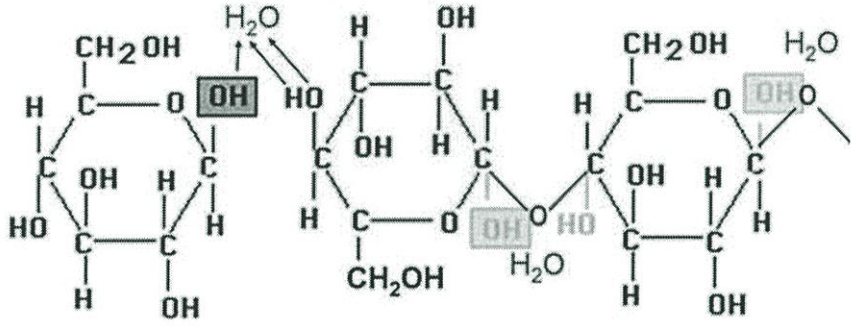
2) เอนไซม์เซลลูเลสที่ได้สามารถนำไปพัฒนาปรับใช้ในอุตสาหกรรมต่อไปได้

บทที่ 2

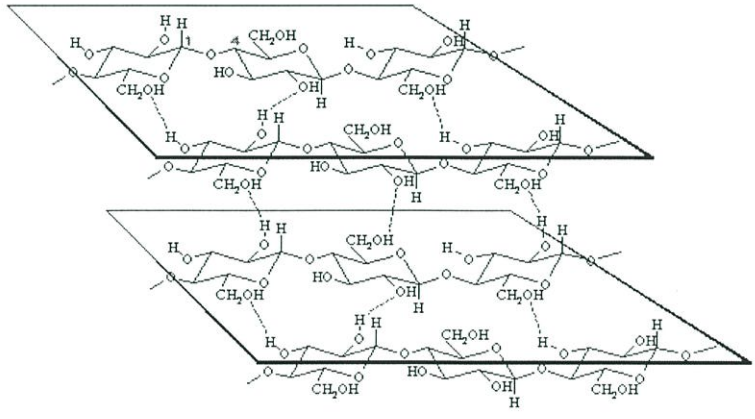
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เซลลูโลส (cellulose)

เป็นคาร์โบไฮเดรท (carbohydrate) ประเภทพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ประเภท ฮอโมพอลิแซ็กคาไรด์ (homopolysaccharide) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส (glucose) มาต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ (glycosidic bond) ที่ตำแหน่งบีต้า-1,4 (b-1,4) เป็นสายยาวมากกว่า 2,000โมเลกุล มีสูตรโมเลกุล $(C_6H_{12}O_5)_n$ (ดุษฎีและคณะ, 2546) (รูปที่ 2.1 -2.2)



รูปที่2.1 โครงสร้างของเซลลูโลส (Anonymous, 2008)



รูปที่ 2.2 ลักษณะการสานกันเป็นร่างแหของเซลลูโลส (Sengbusch, 2003)

2.1.1 ชนิดของเซลลูโลสแบ่งตามความสามารถในการละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ได้เป็น 3 ชนิด (Anonymous, 2007) คือ

2.1.1.1 แอลฟา-เซลลูโลส (α-cellulose) คือเซลลูโลสที่ไม่ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5%

2.1.1.2 เบต้า-เซลลูโลส (β-cellulose) คือเซลลูโลสที่ละลายได้ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5% ที่อุณหภูมิห้องแต่สามารถตกตะกอนได้ง่ายในสารละลายที่มีสภาพเป็นกรด

2.1.1.3 แกมม่า-เซลลูโลส (γ-cellulose) คือเซลลูโลสที่ละลายได้ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5% และสารละลายกรดแต่สามารถตกตะกอนได้โดยใช้แอลกอฮอล์

เซลลูโลสเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างเป็นผลึกหรือเป็น linear homopolymer ของกลูโคสที่จับกันด้วยβ-1, 4-glucosidic linkage ซึ่งยากต่อการย่อยสลายนอกจากนี้โดยธรรมชาติของเซลลูโลสจะมี lignin จับอยู่ซึ่งเป็นตัวขัดขวางปฏิกิริยาการย่อยสลาย

2.1.2 การย่อยสลายเซลลูโลสทำได้ 2 วิธี คือ

2.1.2.1 วิธีการทางเคมีหรือการย่อยสลายด้วยกรดเข้มข้นหรือกรดเจือจาง (acid hydrolysis) เช่น กรดซัลฟูริกและกรดไฮโดรคลอริกซึ่งต้องทำภายใต้อุณหภูมิสูงวิธีนี้มีข้อจำกัดคือให้ปริมาณกลูโคสต่ำและเกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการด้วย

2.1.2.2 วิธีการทางชีวภาพหรือการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzyme hydrolysis) ที่ได้จากจุลินทรีย์ เช่นเชื้อราแบคทีเรียโดยเอนไซม์จากจุลินทรีย์จะทำให้ปฏิกิริยาการย่อยเกิดภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรงคือที่อุณหภูมิประมาณ 50°C ความดันบรรยากาศเพราะเอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารประกอบเซลลูโลสมากทำให้ไม่สูญเสียกลูโคสระหว่างเกิดปฏิกิริยาและไม่เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ

2.2 เซลลูเลส (Cellulase)

ในธรรมชาติการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส เกิดโดยอาศัยการย่อยสลายจุลินทรีย์ในสภาพที่มีออกซิเจน การย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส วิธีนี้เป็นวิธีที่เฉพาะเจาะจงระหว่างเอนไซม์เซลลูเลสกับสารประกอบเซลลูโลสโดยจะไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ปนมาจึงทำให้ได้น้ำตาลกลูโคสซึ่งค่อนข้างบริสุทธิ์ ลักษณะการย่อยจะเกิดขึ้นช้าๆ ปฏิกิริยาเกิดขึ้นในที่มีอุณหภูมิที่สิ่งมีชีวิตสามารถเจริญเติบโตได้และปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่รุนแรง นอกจากนี้ก็อาจไม่จำเป็นต้องใช้ภาชนะที่ทนทานต่อการกัดกร่อน ต้นทุนจึงต่ำกว่าและยังไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม หากแต่วิธีนี้น้ำตาลกลูโคสที่ได้อยู่ในรูปสารละลายเจือจาง (รูปที่ 2.3)(พรเทพ, 2538)

รูปที่ 2.3 โครงสร้างเอนไซม์เซลลูเลส (www.providend.com [03/12/2015])

2.2.1 การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

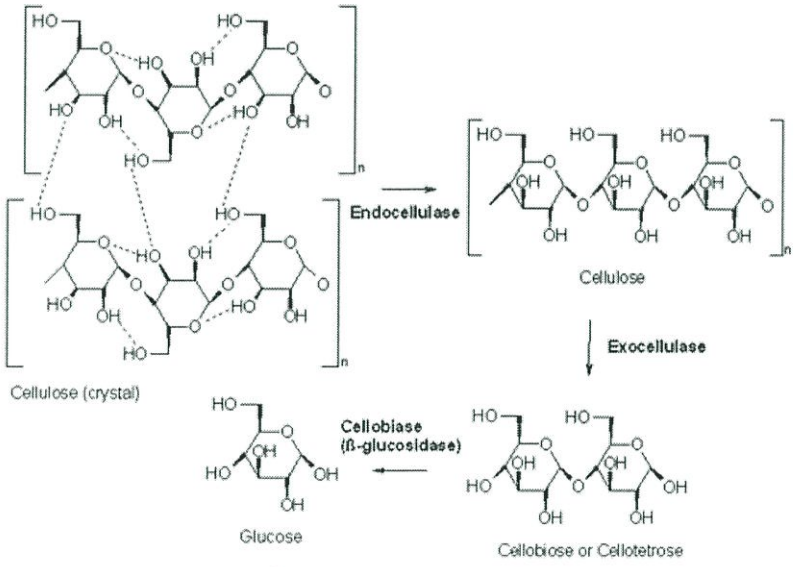
จากการศึกษาระบบเอนไซม์เซลลูเลส (cellulose system) โดยการแยกเอนไซม์เซลลูเลสแต่ละชนิดให้บริสุทธิ์นั้น ทำให้สรุปการจัดระบบการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสได้ว่าประกอบด้วยเอนไซม์ 3 กลุ่ม (รูปที่ 2.4) ตามระบบการจัดจำแนกเอนไซม์ (Enzyme Classification (E.C)) ดังนี้

2.2.1.1 เอนโดกลูคาเนส หรือเอนโด-บีต้า-1,4-กลูคาเนส (E.C.3.2.1.4) ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลลูเลสในส่วนที่ไม่เป็นระเบียบ (amorphous) หรือย่อยอนุพันธ์ของเซลลูโลส เช่น คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethyl cellulose) เซลลูโลสที่ผ่านการทาปฏิกิริยากับกรดฟอสฟอริก (phosphoric swollen cellulose) ไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลส (hydroxyethyl cellulose) และเซลโลโอลิโกเมอร์ (cello-oligomers) โดยตัดย่อยเซลล์ที่ตำแหน่งพันธะบีต้า-1,4-ไกลโคซิดิกแบบ

สุ่ม (random) ทำให้ผลิตภัณฑ์ผสมหลายชนิด คือ เซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ (cellooligo-saccharides), เซลโลเพนธาโอส (cellopentaose), เซลโลไตรโอส (cellotriose), เซลโลไบโอส (cellobiose) และกลูโคส โดยจะได้ผลิตภัณฑ์หลักขึ้นอยู่กับสมบัติของแต่ละเอนไซม์

2.2.1.2 เอกโซกลูคาเนส หรือ เอกโซ-1,4-กลูคาเนส หรือ เอกโซบีต้า-1,4-กลูแคนกลูโคไฮโดรเนส หรือ เอกโซบีต้า-1,4-เซลโลไบโอไฮโดรเนส (E.C.3.2.1.91) พบว่า มักทำหน้าร่วมกับเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสในการย่อยโมเลกุลของเซลลูโลส โดยการย่อยสลายเซลลูโลสจากปลายด้านที่ไม่มีน้ำตาลรีดิวซ์ (non-reducing) ของเซลลูโลสผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายส่วนใหญ่คือ น้ำตาลเซลโลไบโอส นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถย่อยสลายเซลลูโลสที่จัดตัวอย่างเป็นระเบียบ (microcrystalline cellulose) ได้โดยอาศัยการทำงานร่วมกับเอนโดกลูคาเนส 6

2.2.1.3 เอนไซม์บีต้า-1,4-กลูโคไซเนส (E.C.3.2.1.21) เป็นเอนไซม์ที่ทำ หน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลโลไบโอสเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ที่ละลายเป็นน้ำให้ได้น้ำตาลกลูโคส แต่ไม่สามารถย่อยสลายโมเลกุลซับซ้อนขนาดใหญ่ของเซลลูโลสได้โดยตรง กลไกลการย่อยสลายโมเลกุลของเซลลูโลสทั้งในส่วนที่เป็นระเบียบ (crystalline) และไม่เป็นระเบียบ (amorphous) ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส (พิจิตรา, 2548)



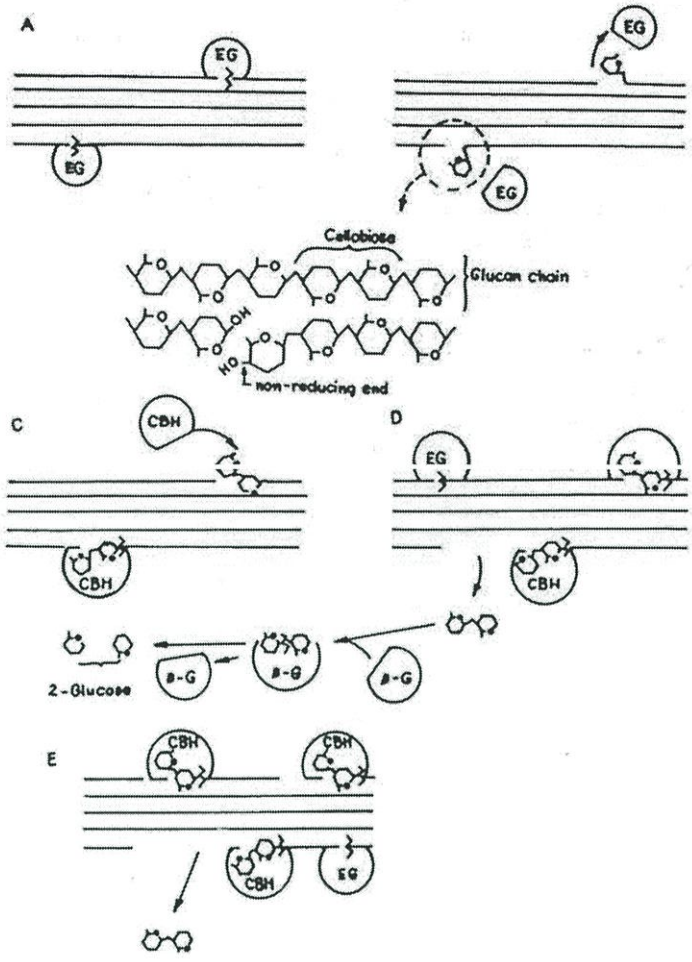
รูปที่ 2.4การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส (Anonymous, 2007)

2.2.2 กลไกการสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลส

กลไกการสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลสประกอบด้วย 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนแรกเป็น prohydrolytic step คือสายโซ่ anhydroglucose จะถูกทำให้บวมขึ้นขั้นที่สองเกิด hydrolytic cleavage ของสายโพลีเมอร์ กลไกการทำงานเริ่มจากเซลลูโลสจะเกิดบวมตัว (swelling) พร้อมกับมีการสลายพันธะไฮโดรเจนซึ่งเกิดจากการทำงานร่วมกันของ endoglucanase และ exoglucanase จะย่อยสลายเซลลูโลสได้ปลายอิสระส่วน exoglucanase จะดึงโมเลกุลของ cellobiose ออกจากปลายซึ่งถูกย่อยสลายต่อไปโดยβ-glucosidase จนได้น้ำตาลกลูโคสอิสระ (รูปที่ 2.4) แสดงในตาราง 2.1 (ศศิธร, 2552)

ตาราง2.1ปฏิกิริยาการสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Mandels and Reese, 1957)

ขั้นตอนที่	ปฏิกิริยา
1	Endo-β-glucanase Native cellulose ⟶ cellulose
2	Exo - β-glucanase Cellulose ⟶ cellobiose
3	Cellobiase Cellobiose ⟶ 2 glucose



รูปที่2.5 กลไกการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส (White, 1982)

A Endoglucanase (EG) จะจับแบบสุ่มบนพื้นผิวของ microfibril ของเซลลูโลส EG จะทำลายพันธะ glycosyl ใน glucan chain

B EG จะหลุดออกจากพื้นผิวของ microfibril glucan chain ทำให้เกิด reducing end และ non-reducing end

C Exo-β-glucanase (CBH) สามารถจะเข้าทำปฏิกิริยาบน free non-reducing end ของ glucan chain

D Cellobilose ถูกปล่อยเข้าสู่สารละลายและถูกเปลี่ยนเป็นกลูโคสโดยβ-glucosidase (β-G)

E EG จะจับอย่างต่อเนื่องบน glucan chains สร้างตำแหน่งที่ CBH สามารถเข้าทำปฏิกิริยา

2.2.3 การวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

Goksoyr และ Eriksen (1980) ได้แบ่งการทำงานของเอนไซม์เป็น 2 วิธีตามความซับซ้อน ของลักษณะเอนไซม์คือ

2.2.3.1 Physical assay เป็นการวัดความสามารถในการทำงานของ complex enzyme ที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture filtrate) ประกอบด้วย 2 วิธีคือ

2.2.3.1.1 การสลายให้ได้น้ำตาล (saccharolytic method) เป็นการวัดปริมาณกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลสในอาหารเพาะเลี้ยงโดย Mandels (1977) ได้รวบรวมวิธีการวัดน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลสโดยใช้dinitrosalicylic acid reagent (DNS reagent) เป็นสารทดสอบซึ่งแตกต่างกันไปตามชนิดของสารตั้งต้นดังนี้

2.2.3.1.1.1 Filter paper assay เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากเนื่องจากกระดาษกรองสามารถเตรียมได้ง่ายวิธีการคือใช้กระดาษกรองขนาด 1x6 cm ปริมาณ 50 mg ใส่ในหลอดทดลองที่มีส่วนผสมของเอนไซม์และบัฟเฟอร์ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 60 นาที เติม DNS reagent 3 ml แล้วนำหลอดไปต้มในน้ำเดือด 5 นาทีทิ้งไว้ให้เย็นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 nm เพื่อหาปริมาณของ reducing sugar

2.2.3.1.1.2 Cotton assay คล้ายกับ filter paperassay แต่ใช้เส้นใยฝ้าย 50 mg เป็นสารตั้งต้นทำปฏิกิริยากับเอนไซม์และบัฟเฟอร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นเติม DNS reagent และหาปริมาณของ reducing sugar

2.2.3.1.1.3 CMC assay เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการวัดการทำงานของเซลลูเลส เนื่องจาก CMC เป็นสารที่สามารถละลายน้ำได้ดีจึงสะดวกต่อการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ ในการวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์จะบ่ม 1% CMC ใน 0.05 M citrate buffer pH 4.8 กับเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30 นาทีจากนั้นเติม DNS reagent เพื่อหาปริมาณของ reducing sugar

2.2.3.1.1.4 Amorphous cellulose assay วิธีนี้จะวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์โดยบ่ม 1% walseth cellulose ใน 0.05 M citrate buffer pH 4.8 กับ

เอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 60 นาทีนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อนำส่วนใส (supernatant) ไปหาปริมาณ reducing sugar โดยการทำปฏิกิริยากับ DNS reagent

2.2.3.2 Biochemical assay เป็นการวัดความสามารถในการทำงานของ complex cellulose เฉพาะแต่ละองค์ประกอบเท่านั้น

2.2.3.2.1 Endoglucanase นิยมใช้ CMC และ hydroxyethyl cellulose เป็นสารตั้งต้นโดยวัดจากค่าความหนืดที่เปลี่ยนไปซึ่งมีค่าลดลงเมื่อเวลาของปฏิกิริยาเปลี่ยนไปเป็นวิธีที่ยุ่งยากจึงใช้วิธีวัดปริมาณ reducing sugar จากการทำปฏิกิริยากับ DNS reagent ที่เกิดขึ้นแทน

2.2.3.2.2 Exoglucanase วิธีนี้ยังไม่มีสารตั้งต้นที่จำเพาะต่อ exoglucanase ดังนั้นการวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์นี้จึงจำเป็นต้องสกัดให้ได้ exoglucanase ที่บริสุทธิ์ก่อนนำมาทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นซึ่งจะใช้เซลลูโลสที่มีอัตรา polymerization ต่ำ เช่น avicel หรือเซลลูโลสที่ผ่านการแช่ด้วยกรดฟอสฟอริก

2.2.3.2.3 β-glucosidase นิยมใช้ cellobiose และ p-nirophenyl-β-D-glucoside (pNPG) เป็นสารตั้งต้นโดยหากใช้ cellobiose เป็นสารตั้งต้นนิยมวัดปริมาณของกลูโคสที่ได้จากการย่อยแต่หากใช้ pNPG จะมีการเติมโซเดียมคาร์บอเนตหลังจากการบ่มกับเอนไซม์จากนั้นวัดปริมาณreducing sugar ที่ปลดปล่อยออกมา (ศศิธร, 2552)

2.2.4 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

2.2.4.1 จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสเนื่องจากเซลลูโลสมีลักษณะโครงสร้างทางเคมีสายยาว จุลินทรีย์ไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้โดยตรงดังนั้นจุลินทรีย์ต้องสร้าง extracellular enzyme ออกมาย่อยเซลลูโลสให้เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้และสามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ได้เอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้ มีสิ่งมีชีวิตหลายชนิดสามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ เช่น จุลินทรีย์ จุลินทรีย์หลายชนิดที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อยสลายเซลลูโลสมักอยู่ในกลุ่มเชื้อรา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยสิท ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้เชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย และเชื้อแอคติโนมัยสิท

เชื้อรา	เชื้อแบคทีเรีย	เชื้อแอคติโนมัยสิท
Alternaria sp.	*Bacillus sp.*	*Micrormonospora sp.*
Aspergillus sp.	*Cellulomonas sp.*	*Nocardia sp.*
Chaetomium sp.	*Clostridium sp.*	*Streptomyces sp.*
Corprinus sp.	*Corynebacterium sp.*	*Streotosporangium sp.*
Foames sp.	*Cytophaga sp.*	
Fusarium sp.	*Polyangium sp.*	
Myrothecium sp.	*Pseudomonas sp.*	
Penicillium sp.	*Sporocytophaga sp.*	
Polyporus sp.	*Vibrio sp.*	
Rhizoctonia sp.		
Sporotrichum sp.		
Thielavia sp.		
Trametes sp.		
Trichothecium sp.		
Trichoderma sp.		
Verticillium sp.		
Zygorhynchus sp.		

ที่มา : พรเทพ (2538)

ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อจุลินทรีย์ปัจจัยสำคัญที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์นอกจากจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์แล้วยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆอีก เช่น ชนิดความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรอง รวมไปถึงสภาพแวดล้อมการผลิตซึ่งได้แก่อายุและปริมาณของเชื้อเริ่มต้น ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) อุณหภูมิ การให้อากาศและอัตราการเขย่า (พรเทพ, 2538)

2.2.5 การนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์

จุลินทรีย์เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ที่สำคัญจึงมีการนำเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์มาใช้ในกระบวนการผลิตสารสำคัญหลายชนิดโดยมีเซลลูโลสเป็นวัตถุดิบสำคัญเนื่องจากหาง่ายและเป็นการลดปัญหาสิ่งแวดล้อม(Goksoyr and Eriksen, 1980)

2.2.5.1 ตัวอย่างของการนำเอนไซม์เซลลูเลสไปใช้ประโยชน์ได้แก่

(1)สกัดสารในใบชาถั่วเหลืองมันเทศแป้งข้าวโพดและวุ้น

(2) ผลิตน้ำส้มสายชูจากเยื่อส้มและเยลลี่จากสาหร่าย

(3)ย่อยเซลลูโลสที่ตกค้างจากโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษ

(4)ย่อยเปลือกถั่วเหลือง

(5) เปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่ออาหารของผักข้าวเจ้า และข้าวเหนียว

(6) เป็นส่วนผสมในผงซักฟอกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการขจัดคราบ

(7) ช่วยแยกเซลล์เดี่ยวและ active protoplast ของพืช

(8) ช่วยทำให้น้ำผักผลไม้ใสขึ้น

(9) ช่วยย่อยสลายเซลลูโลสในสิ่งปฏิกูล

(10)นำกลูโคสไปใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิตแอลกอฮอล์

ปัจจุบันมีการนำเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์มาผลิตเพื่อการค้าโดยมีการผลิตอย่างแพร่หลายในระดับอุตสาหกรรมซึ่งมีจำหน่ายในบริษัทยักษ์ใหญ่ทางด้านสารเคมีและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์หลายแห่ง เช่น ในปี 2008 บริษัท Fluka มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จาก*Aspergillus niger*จำหน่ายในราคา 4,365 บาทต่อ 25 กรัมส่วนบริษัท Sigma ผลิตจาก*Aspergillus niger* จำหน่าย 5,000 unit ในราคา 1,656 บาทนอกจากนั้นยังมีการผลิตจาก*Trichoderma reesei*โดยจำหน่าย 5,000 unit ในราคา 3,032 บาทและจาก*Trichoderma viridae*ขาย 5,000 unit ในราคา 5,259 บาท (Anonymous, 2008)

2.3 มูลวัว

ส่วนใหญ่เป็นของแข็งประกอบไปด้วยเศษของพืชและสัตว์ซึ่งเป็นอาหารที่สัตว์กินเข้าไปแล้วไม่สามารถย่อยหรือนำไปใช้ประโยชน์ได้หมดจึงเหลือเป็นกากที่สัตว์ขับถ่ายออกมา โดยเศษอาหารเหล่านี้ได้ผ่านกระบวนการย่อยสลายไปบางส่วนแล้วในทางเดินอาหาร ดังนั้นส่วนที่เป็นมูลสัตว์จึงอุดมไปด้วยธาตุอาหารชนิดต่างๆ รวมทั้งสารอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้หลายชนิด ซึ่งเมื่อรวมกันเข้าก็จะมีองค์ประกอบที่สามารถใช้เป็นธาตุอาหารที่สมบูรณ์ของพืชได้ ส่วนมูลสัตว์แต่ละชนิดจะมีธาตุอาหารชนิดใดมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารที่สัตว์ชนิดนั้นกินเข้าไปเป็นปัจจัยสำคัญ รวมทั้งปัจจัยอื่นๆได้แก่ วิธีการให้อาหาร รวมทั้งการจัดการรวบรวมมูลระบบการย่อยอาหาร ระบบอาหารของวัวมีความแตกต่าง โครงสร้างของกระเพาะอาหารแบ่งออกเป็น 4 ส่วน โดยกระเพาะอาหาร 3 ส่วนแรก เป็นส่วนที่ขยายขนาดขึ้นของหลอดอาหาร ไม่มีการสร้างน้ำย่อยในการย่อยอาหาร กระเพาะอาหารส่วนที่ 4 เป็นกระเพาะอาหารจริง กระเพาะอาหารส่วนที่ 4 เป็นกระเพาะอาหารจริง (รูปที่ 2.6)

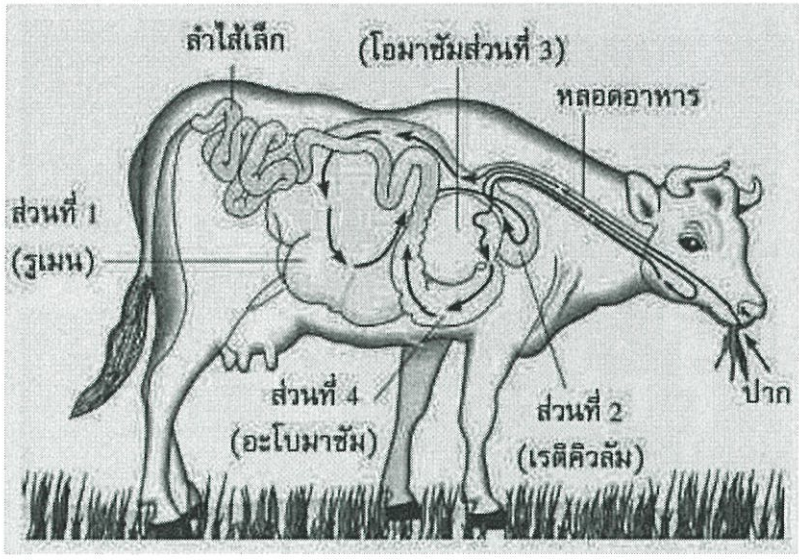
2.3.1 กระเพาะอาหาร ทั้ง 4 ส่วนมีชื่อและลักษณะเฉพาะ คือ

2.3.1.1 กระเพาะผ้าขี้ริ้วหรือรูเมน (rumen) เป็นกระเพาะอาหารที่มีจุลินทรีย์พวกแบคทีเรียและโพรโทซัวจำนวนมาก จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถสร้างน้ำย่อยเซลลูเลสช่วยย่อยสลายสารเซลลูโลสจากพืชที่กินเข้าไปได้นอกจากนี้ยังสามารถสำรอกอาหารออกมาเคี้ยวเอื้องเป็นครั้งคราวเพื่อบดเส้นใยให้ละเอียดได้ด้วยจึงเรียกสัตว์พวกนี้ว่า สัตว์เคี้ยวเอื้อง แบคทีเรียและโพรโตซัวยังสามารถสังเคราะห์กรดไขมันจากสารคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้และสังเคราะห์กรดอะมิโนจากยูเรียและแอมโมเนียหรือได้จากการย่อยสลายโปรตีนจากพืช อาหารเหล่านี้จะถูกส่งเข้าสู่กระเพาะอาหาร ส่วนเรติ คิวลัมและโอมาซัมต่อไป

2.3.1.2 กระเพาะรวงผึ้งหรือเรติคิวลัม (reticulum) ทำหน้าที่ย่อยนม เมื่อวัว กระบือยังเล็กอยู่ และมีแบคทีเรียเช่นเดียวกับกระเพาะอาหารส่วนแรก

2.3.1.3 กระเพาะสามสิบกลีบหรือโอมาซัม (omasum) ทำหน้าที่ผสมและบดอาหาร นอกจากนี้ยังดูดซึมและซับน้ำจากกระเพาะผ้าขี้ริ้วด้วย

2.3.1.4 กระเพาะจริงหรืออะโบมาซัม (abomasum) เป็นส่วนกระเพาะอาหารจริง มีการย่อยอาหารและจุลินทรีย์ไปพร้อมๆ กัน แล้วจึงส่งอาหารต่อไปยังลำไส้เล็กเพื่อย่อยให้สมบูรณ์ ดังนั้น วัว ควาย จึงได้สารอาหารจากอาหารและจุลินทรีย์ไปพร้อมๆ กัน จึงเพียงพอต่อความต้องการ เมื่ออาหารย่อยในกระเพาะอาหารแล้วจะผ่านเข้าสู่ลำไส้เล็กตอนต้น จะมีการย่อยโปรตีน ไขมันและแป้งจากน้ำย่อยของตับอ่อนและน้ำดีจากตับจะช่วยให้ไขมันแตกตัวและย่อยได้ง่ายขึ้น ต่อจากนั้นจึงดูดซึมเข้าสู่ระบบหมุนเวียนโลหิตต่อไป (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน 2549)



รูปที่ 2.6 โครงสร้างกระเพาะวัว (http://www.krusarawut.net/ [03/12/2014])

2.3.2 จุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน

2.3.2.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่มีอยู่เป็นปริมาณมากที่สุดใน reticulo-rumen การจำแนกชนิดของ แบคทีเรีย สามารถจำแนกได้หลายแบบ เช่น จำแนกตามส่วนต่างในกระเพาะ rumen ที่ แบคทีเรีย ยึดเกาะอยู่ หรือจำแนกตามการใช้ประโยชน์อาหารหรือผลผลิตที่สังเคราะห์ได้ การจำแนก แบคทีเรีย ตามส่วนต่างๆที่ แบคทีเรีย เกาะอยู่

2.3.2.1.1 แบคทีเรีย ที่อยู่ใน rumen fluid
(ประมาณ 30% ของ แบคทีเรีย ทั้งหมด)

2.3.2.1.2แบคทีเรีย ที่เกาะอยู่กับอนุภาคอาหาร
(ประมาณ 70% ของ แบคทีเรีย ทั้งหมด)

2.3.2.1.3แบคทีเรีย ที่เกาะอยู่ตามเนื้อเยื่อของกระเพาะ rumen

2.3.2.1.4 แบคทีเรีย ที่เกาะอยู่กับ protozoa
(ส่วนใหญ่จะเป็นพวก methanogens)

2.3.2.2 การจำแนกตามการใช้ประโยชน์ของอาหารหรือผลผลิตที่สังเคราะห์ได้

2.3.2.2.1 Cellulolytic แบคทีเรีย

กลุ่มนี้จะใช้ cellulose โดยมีการผลิต cellulose เข้าย่อยสลาย cellulose นอกจากนี้อาจย่อย cellobiose ซึ่งประกอบด้วย glucose 2 โมเลกุลได้ แบคทีเรีย กลุ่มนี้มีมากที่สุดในกระเพาะรูเมนของสัตว์ที่ได้รับอาหารหยาบเป็นหลัก แบคทีเรียชนิดที่สำคัญในกลุ่มนี้ได้แก่ *Ruminococcus flavefaciens, R. albus, Bacteroides succinogenes* ในบางขณะ *Cillobacterium cellulosolvens* และ *Clostridium spp.* ต่างๆ ก็มีส่วนช่วยในการย่อย cellulose Hungate (1966) ทำการแยกเชื้อ *Clostridium lochhaedii* จากรูเมนของวัวที่ได้รับอาหารหยาบที่ผ่านการปรุงแต่งด้วยเกลือ (Salt-Treated Roughages) *Clostridiumlochhaedii* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีการสร้าง สปอร์ (ไม่เหมือนกับ แบคทีเรีย ชนิดอื่นๆ) มีความสามารถในการย่อยสลาย cellulose ได้ดีกว่าจุลินทรีย์อื่นๆ หลายเท่า

2.3.2.2.2 Hemicellulolytic แบคทีเรีย

โดยปกติแบคทีเรียที่ย่อย cellulose ได้ก็จะสามารถย่อย hemicellulose ได้ด้วย แต่แบคทีเรียที่ย่อย hemicellulose จะไม่สามารถย่อย cellulose ได้ ชนิดที่สำคัญ ได้แก่ *Butyrivibriofibrisolvens,Lachnosperia multiparens* และ *Bacteroides ruminicola* เป็นต้น

2.3.2.2.3 Amylolytic แบคทีเรีย

แบคทีเรียชนิดนี้จะมีเป็นจำนวนมากในรูเมนของสัตว์ที่ได้รับอาหารข้นที่มี amylose อยู่สูง ชนิดของแบคทีเรียที่สำคัญได้แก่*Bacteroides amylophilus, Succinimonas amylophilus, Butyrivibrio fibrisolvens, Selenomonas ruminantium,* และ *Bacteroidesruminicola* เป็นต้น จะเห็นว่าแบคทีเรียที่สามารถย่อย cellulose หลายสปีชีส์สามารถที่จะย่อย carbohydrates ได้ด้วย แต่แบคทีเรียที่ย่อย carbohydrates โดยตรง ไม่สามารถที่จะย่อย cellulose ได้

2.3.2.2.4 Acid-utilizing แบคทีเรีย

มีแบคทีเรียหลายชนิดที่สามารถใช้กรดต่างๆได้ เช่น กรด formic, acetic, malic, fumaric, lactic และ succinic แบคทีเรียจำพวกนี้ได้แก่ *Veillonella gazogenes, V. alacalesceus, Propionic แบคทีเรียn sp., Selemonas ruminantium* และ *Selemonas lactilytica* เป็นต้น

2.3.2.2.5Proteolytic แบคทีเรีย

แบคทีเรียหลายๆสปีชีส์จะใช้ amino acids เป็นแหล่งพลังงาน ได้แก่ *Bacteroides amylophilus, Clostridium sporogens* และ *Bacillus licheniformis* เป็นต้น

2.3.2.2.6 Ammonia-producing แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ผลิตแอมโมเนีย ได้แก่ *Bacteroides ruminicola, Selenomonas ruminantivu, Reptostreptococcus eslsdenii* และ *Butyrivibrio spp.*

2.3.2.2.7 Methanogenic แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ดำรงชีวิตภายใต้สภาวะไร้อากาศในวงจรชีวิตของมัน เมทาโนเจน จะย่อยสารอาหารและปล่อยก๊าซต่างๆ ซึ่งรวมถึงมีเทนด้วย เมทาโนเจน มีอยู่หลายชนิดที่สำคัญ ได้แก่ *Methanobacterium ruminatium* และ *M. formicicum*

2.3.2.2.8 Lipolytic แบคทีเรีย

แบคทีเรียหลายชนิดมีความสามารถใช้ glycerol แต่ยังไม่ทราบเป็นที่แน่ชัดว่าสปีชีส์ ใดที่มีความสามารถในการย่อย lipid ได้glycerol

2.3.2.2.9 Vitamin-synthesising แบคทีเรีย

ถึงแม้จะทราบว่ามี แบคทีเรียหลายสปีชีส์มีความสามารถในการสังเคราะห์ vitamin B complex ได้ แต่การศึกษายังไม่ทราบชัดว่าเป็นสปีชีส์ใดที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลาย cell wall polysaccharides

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง
2. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
3. ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar air flow)
4. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)
5. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
6. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Shaker Incubator)
7. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
8. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophometer)
9. ไมโครปิเปต (micropipet)
10. เครื่องแก้วต่างๆ

3.1.2 สารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Nutrient borth (NB)
2. Carboxymethylcellulose (CMC)
3. วุ้น (Agar)
4. Sodium chloride (NaCl)

148961

5. Dinitrosalicylic acid (DNS reagent)

6. Congo red

7. เอทานอล (Ethanol)

8. ไดเบสิก โซเดียมฟอสเฟต (dibasic sodium phosphate)

9. โมโนเบสิกโซเดียมฟอสเฟต (monobasic sodium phosphate)

10. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

3.2 วิธีดำเนินงานวิจัย

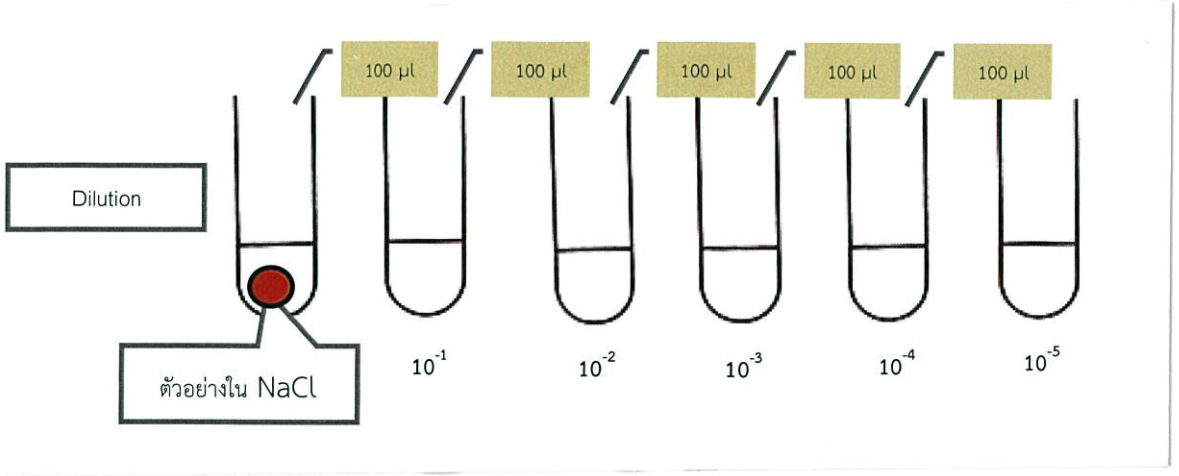
3.2.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย

ทำการเก็บตัวอย่างมูลวัวสดจากฟาร์มเลี้ยงสัตว์และวิจัย หลักสูตรสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ใส่ภาชนะและปิดฝาเพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์

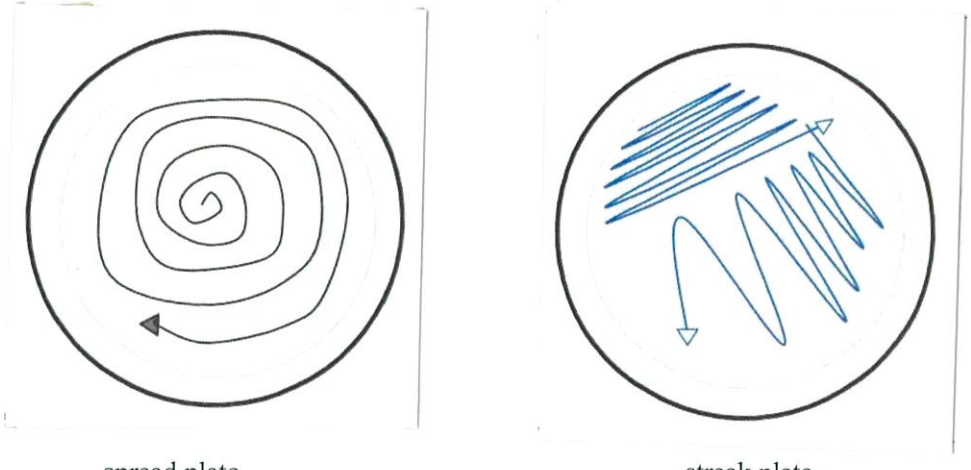
3.2.2 การคัดเลือกและศึกษาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากมูลวัว

3.2.2.1 การแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสจากมูลวัว

นำตัวอย่างมูลวัวที่เก็บได้มาทำการเจือจางด้วยเทคนิค serial dilution ในสารละลาย Sodium chloride (NaCl) ปลอดเชื้อความเข้มข้น 0.85% (w/v) ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-1} - 10^{-5}เท่า (รูปที่ 3.1) ทำการปิเปตตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางมา 50 ไมโครลิตร ลงบนอาหารแข็ง Nutrient agar (NA) ผสม Carboxymethylcellulose (CMC) (ภาคผนวก ก) ใช้แท่งแก้ว (spreader) จุ่มเอทานอลร้อยละ 95 เผาไฟ นำไปเกลี่ยสารละลายให้กระจายทั่วอาหาร โดยใช้เทคนิค spread plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวๆ ที่เจริญบนผิวหน้าของอาหารมาคัดแยกต่อโดยใช้เทคนิค streak plate ลงบนอาหารแข็ง (NA + CMC) และบ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 3.2)



รูปที่ 3.1 การเจือจางด้วยเทคนิค serial dilution ความเข้มข้น 10^{-1} - 10^{-5}เท่า

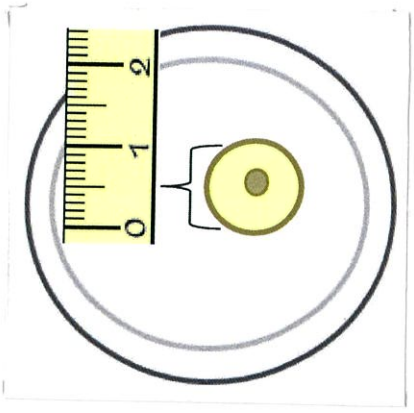


spread plate streak plate

รูปที่ 3.2 เทคนิคการ spread plate และ streak plate

3.2.2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส

ศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase enzyme) จากการวัดบริเวณส่วนใส โดยนำโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนผิวหน้าของอาหารแข็งที่คัดเลือกมาทำการ point ลงบนอาหารแข็งและทำการวัดขนาดของวงใสด้วยการย้อมสี Congo red (Hendricks และ Doyle, 1995) เข้มข้น 0.1% (w/v) (ภาคผนวก ข) ให้ท่วมเชื้อเป็นเวลา 15 นาที เททิ้งแล้วเททับด้วยสารละลาย NaCl เข้มข้น 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) จะปรากฏวงใสที่ไม่ติดสีแดงของ congo red (รูปที่ 3.3) ซึ่งจะเกิดการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลส และทำการเก็บเชื้อที่เกิดวงใสโดย streak plate ลงบนอาหารแข็งเพื่อนำไปศึกษาดูการเจริญเติบโตและลักษณะของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ด้วยวิธีการย้อมแกรมต่อไป (ภาคผนวก ค)



รูปที่ 3.3 การวัดขนาดของวงใสหลังการย้อมสี Congo red

3.2.3 การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.2 ลงขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหารเหลว Nutrient broth ผสม Carboxymethylcellulose (CMC) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 140 รอบต่อนาทีทำการวัดการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เกิดขึ้นในแต่ละช่วงเวลาด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างช่วงเวลากับค่าการดูดกลืนแสง

3.2.4 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส

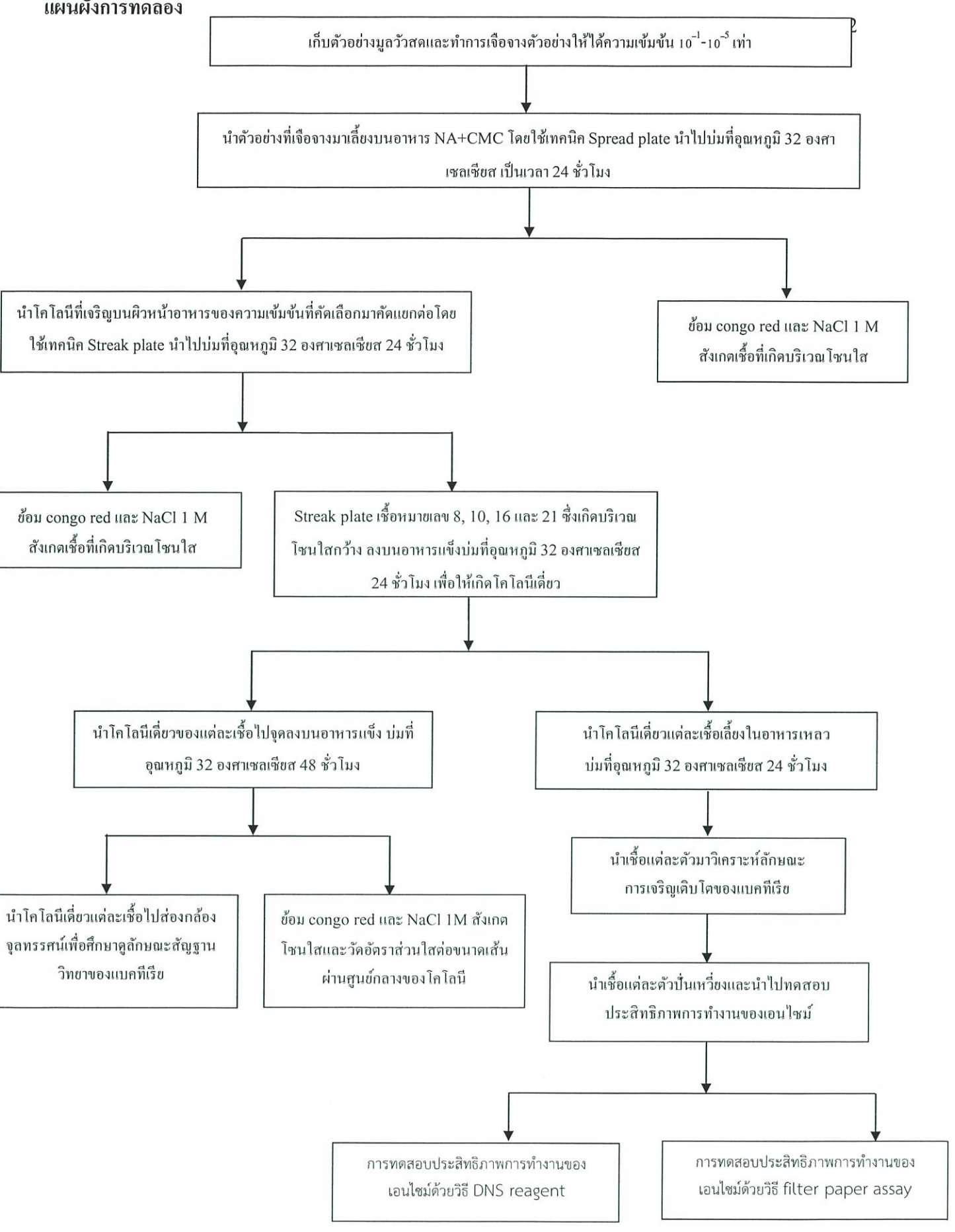
3.2.4.1 การทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธี DNS reagent

บ่มเอนไซม์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับ 1% carboxy methyl cellulose (CMC) ใน 0.05 M phosphate buffer pH 7.0 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาทีจากนั้นจึงวัดการทำงานของเอนไซม์จากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยเติม Dinitrosalicylic acid (DNS) reagent (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาการเกิดสีด้วยการทำให้เย็นทันทีและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยเทียบกับค่ากลูโคสจากกราฟมาตรฐานและคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (ภาคผนวก ง)

3.2.4.2 การทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธี filter paper assay

บ่มเอนไซม์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 10.5 มิลลิกรัม และ 1% carboxy methyl cellulose (CMC) ใน 0.05 โมลาร์ phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที วัดการทำงานของเอนไซม์จากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยเติม Dinitrosalicylic acid (DNS) reagent ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาการเกิดสีด้วยการทำให้เย็นทันทีและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยเทียบกับค่ากลูโคสจากกราฟมาตรฐานและคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (ภาคผนวก ง)

แผนผังการทดลอง

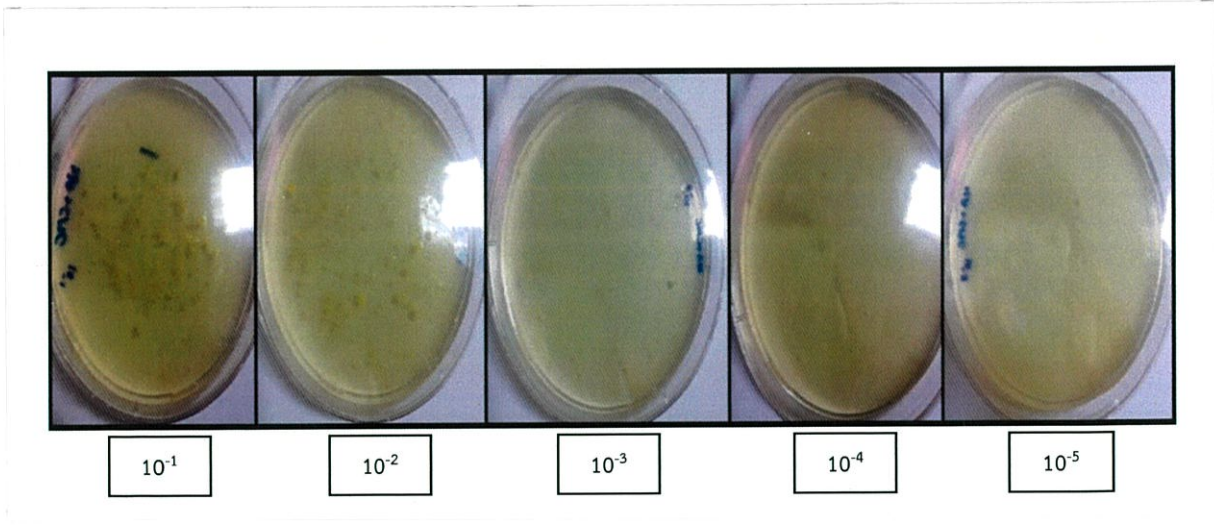


บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

โครงงานพิเศษนี้ทำการศึกษาการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้จากมูลวัว รวมไปถึงความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ และวัดการเจริญเติบโตของเชื้อในช่วงเวลาต่าง ๆ พร้อมกับการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตขึ้นจากแบคทีเรียในช่วงเวลาต่างๆ กันซึ่งสามารถอธิบายได้ดังนี้

4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยเซลลูโลส

ทำการเจือจางตัวอย่างมูลวัวความเข้มข้นที่ 10^{-1} - 10^{-5}เท่า ลงในอาหารเลี้ยงแข็ง (NA + CMC) โดยวิธีการ spread plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 4.1) ได้จำนวนแบคทีเรียทั้งสิ้น 238 ไอโซเลทนำมาย้อม Congo red ครั้งที่ 1 คัดเลือกโคโลนีที่เกิดวงใสที่เจริญบนผิวหน้าของอาหารได้จำนวนแบคทีเรียที่เกิดวงใสทั้งสิ้น 26 ไอโซเลท นำแบคทีเรียดังกล่าวมาคัดแยกต่อโดยใช้เทคนิค streak plate ลงบนอาหารแข็ง (NA + CMC) และบ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

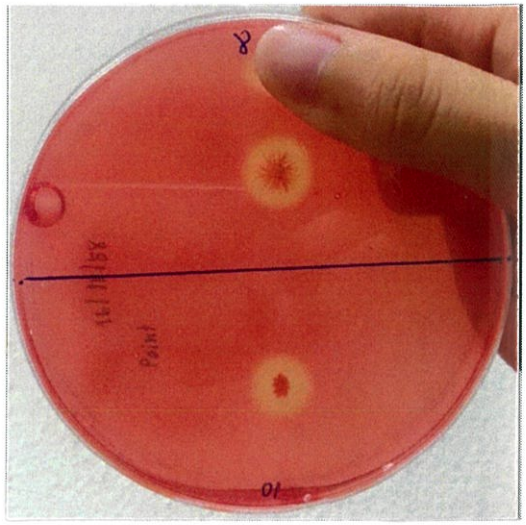


รูปที่ 4.1spread plate ตัวอย่างมูลวัวความเข้มข้นที่ 10^{-1} - 10^{-5}เท่าหลังจากทำการบ่ม

4.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส

ในการคัดเลือกขั้นแรกจะทำการศึกษาบริเวณส่วนใสของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยนำเชื้อที่ทดสอบบนอาหารแข็ง (NA + CMC) ย้อมด้วยสี Congo red ถ้าเกิดโซน

ใสแสดงว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มีแนวโน้มที่จะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ จากการทดลองได้คัดเลือกแบคทีเรียที่มีบริเวณส่วนใสสูงที่สุดได้แก่เชื้อแบคทีเรียหมายเลข 8 10(รูปที่ 4.2) 16และ 21(รูปที่4.3)(แสดงผลความกว้างของวงใสดังตารางที่ 1)



รูปที่4.2ลักษณะการเกิดโซนใสรอบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อหมายเลข8 และ 10

รูปที่ 4.3ลักษณะการเกิดโซนใสรอบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อหมายเลข16 และ 21

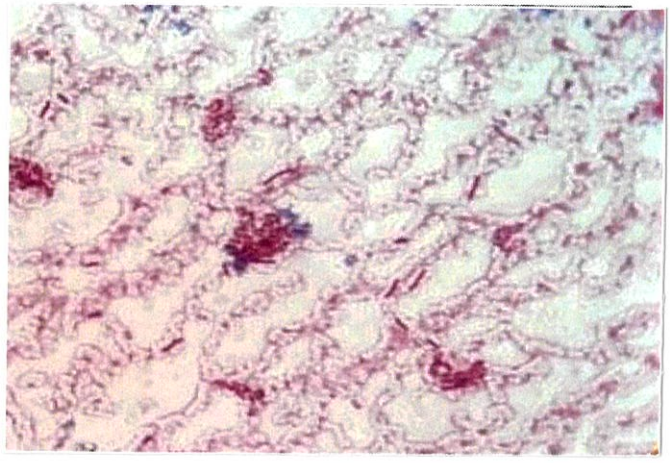
ตารางที่4.1 ลักษณะความกว้างวงใสของเชื้อทั้ง 4 ชนิด (point)

ตัวอย่าง	ความกว้าง (cm)
1. เชื้อหมายเลข 8	1.67
2. เชื้อหมายเลข 10	2.95
3. เชื้อหมายเลข 16	1.63
4. เชื้อหมายเลข21	4.00

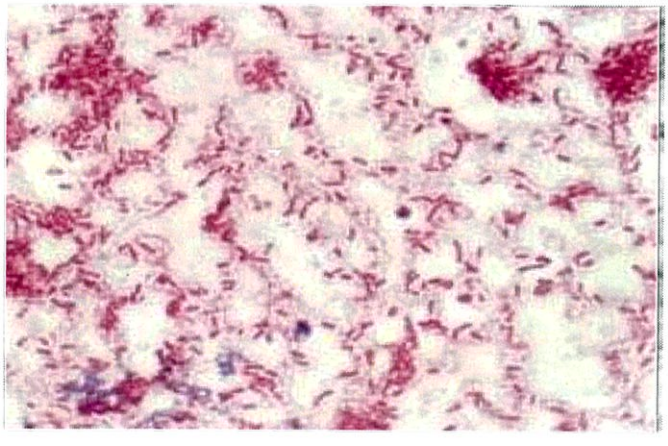
เมื่อได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียได้แล้ว จากนั้นจึงทำการย้อมแกรมเพื่อศึกษาลักษณะรูปร่างของเชื้อแบคทีเรียจากการศึกษาลักษณะการเรียงตัวและการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียจากมูลวัวที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้พบว่า เชื้อแบคทีเรียหมายเลข 8 เป็นเชื้อติดสีแกรมลบ รูปร่างกลมหรือรีลักษณะการเรียงตัวอยู่เป็นกลุ่มเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 10 16 และ 21 เป็นเชื้อแบคทีเรียติดสีแกรมลบ รูปร่างรีลักษณะการเรียงตัวอยู่เป็นกลุ่มเช่นเดียวกัน (แสดงในตารางที่ 2 รูปที่ 4.4,4.5,4.6 และ 4.7 ตามลำดับ)

ตารางที่ 4.2 ผลการจัดกลุ่มจากการศึกษาลักษณะรูปร่างของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสที่คัดเลือกได้จากมูลวัว

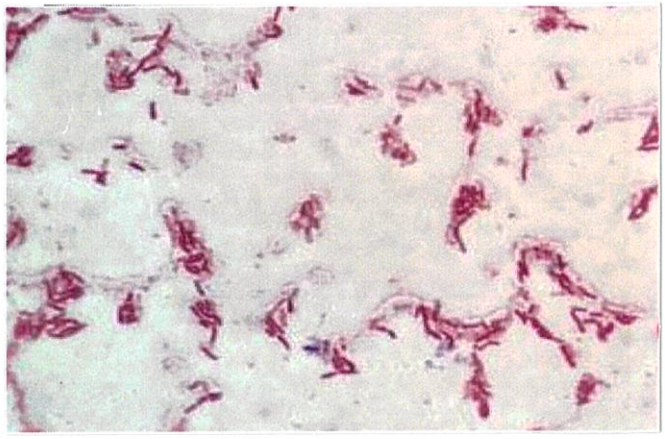
กลุ่มเชื้อ	ลักษณะสัณฐานวิทยา			หมายเหตุ
	แกรม	รูปร่าง	การจัดเรียงตัว	
หมายเลข 8	ลบ	รี	กลุ่ม	รูปที่ 4.4
หมายเลข 10	ลบ	รี	เดี่ยวและกลุ่ม	รูปที่ 4.5
หมายเลข 16	ลบ	รี	กลุ่ม	รูปที่ 4.6
หมายเลข 21	ลบ	รี	เดี่ยว	รูปที่ 4.7



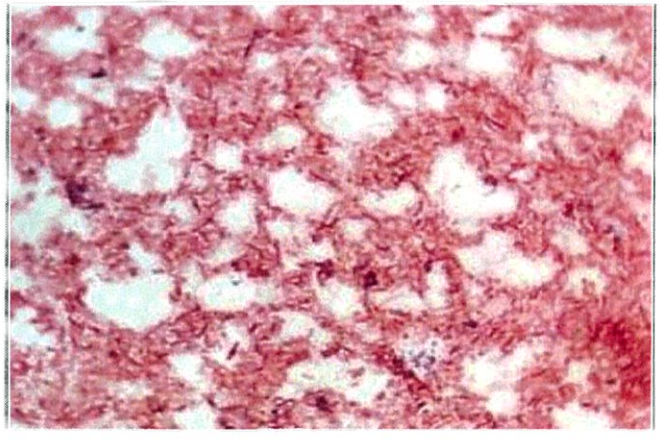
รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะแกรมรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากมูลวัวของเชื้อหมายเลข 8เชื้อติดสีแกรมลบรูปร่างกลมรีลักษณะการเรียงตัวอยู่เป็นกลุ่มๆ



รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะแกรมรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากมูลวัวของเชื้อหมายเลข 10 เชื้อติดสีแกรมลบรูปร่างรีลักษณะการเรียงตัวอยู่เป็นคู่และกลุ่ม



รูปที่ 4.6 แสดงลักษณะแกรมรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากมูลวัวของเชื้อหมายเลข 16 เชื้อติดสีแกรมลบรูปร่างรีลักษณะการเรียงตัวอยู่เป็นกลุ่ม



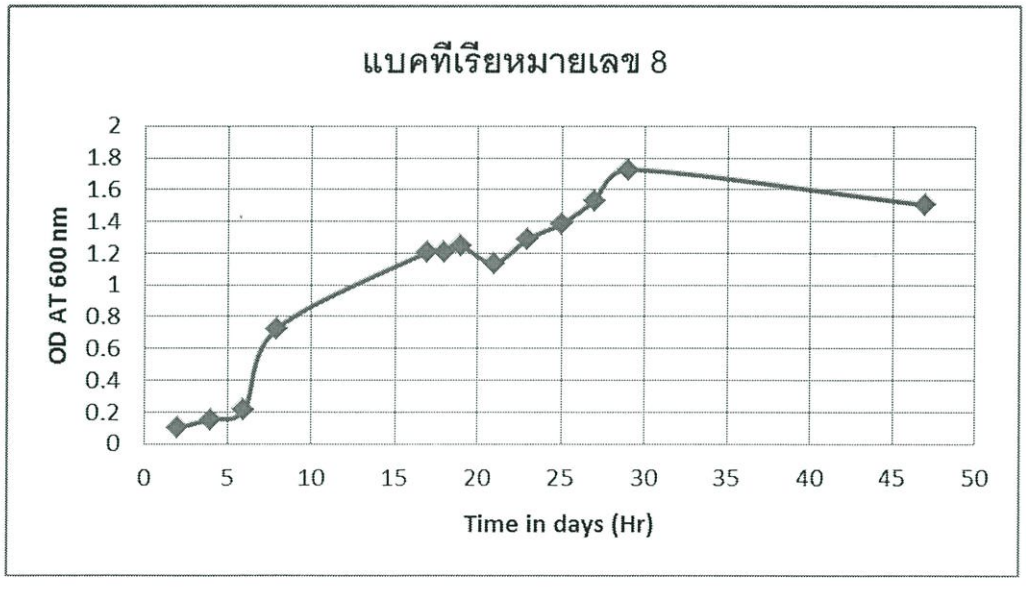
รูปที่ 4.7 แสดงลักษณะแกรมรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากมูลวัวของเชื้อหมายเลข 21 เชื้อติดสีแกรมลบรูปร่างรีลักษณะการเรียงตัวอยู่เป็นกลุ่ม

4.3 การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

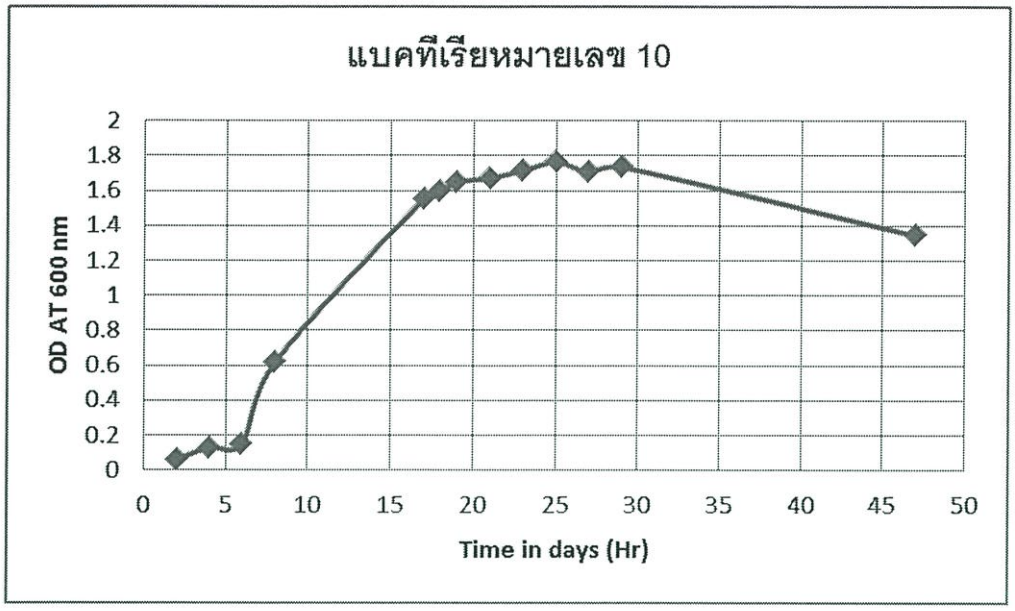
จากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการทดสอบประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสด้วยการย้อมสี Congo red พบว่าได้เชื้อแบคทีเรียทั้งสิ้นจำนวน 4 ไอโซเลท คือ หมายเลข 8 10 16 และ 21 จึงนำแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลทมาวัดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย โดยจะนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลทมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว(NB + CMC) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 140 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ทำการวัดการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เกิดขึ้นในแต่ละช่วงเวลาที่ต่างกันคือ 2, 4, 6, 8, 17, 18, 19, 21, 23, 25, 27, 29 และ 47 ชั่วโมง ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างช่วงเวลากับค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ของเชื้อแต่ละตัว(รูปที่ 4.8,4.9, 4.10 และ 4.11)

ตารางที่ 4.3 แสดงช่วงเวลาในการเจริญเติบโตของเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลท

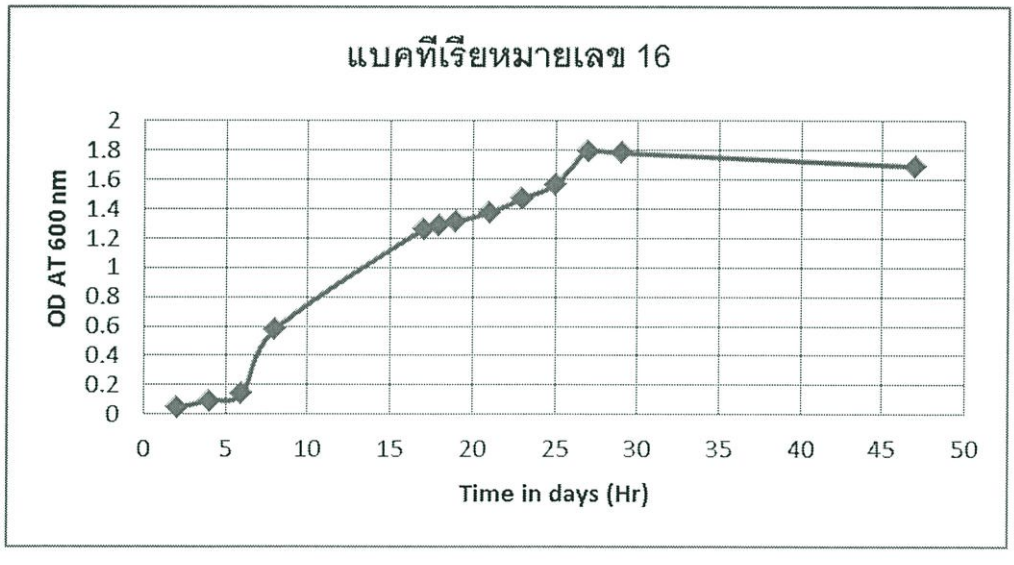
หมายเลขแบคทีเรีย	ระยะเวลาในการเจริญเติบโตสูงที่สุด (ชั่วโมง)
แบคทีเรียหมายเลข 8	29
แบคทีเรียหมายเลข 10	25
แบคทีเรียหมายเลข 16	27
แบคทีเรียหมายเลข 21	17



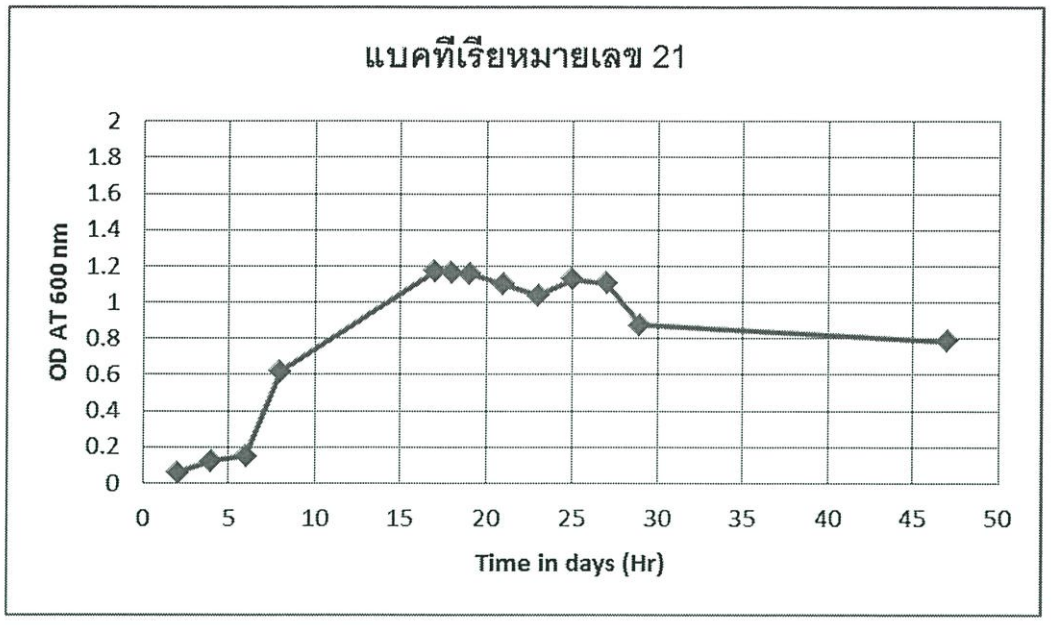
รูปที่ 4.8 การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 8



รูปที่ 4.9การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 10



รูปที่ 4.10 การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 16



รูปที่ 4.11 การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 21

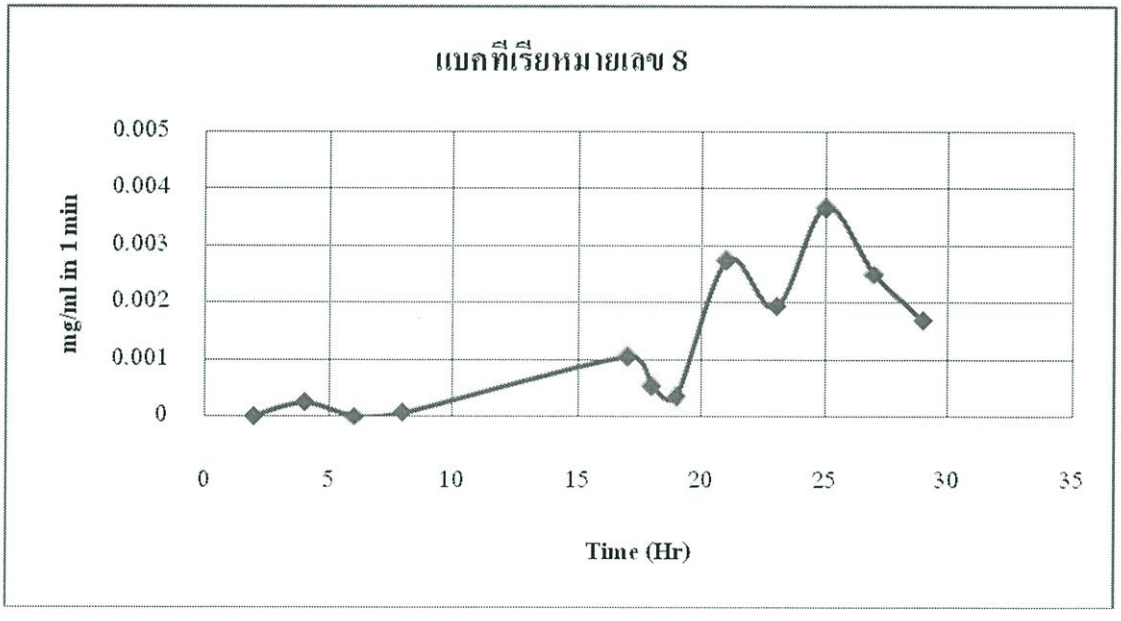
4.4 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส

4.4.1 การทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธี DNS reagent

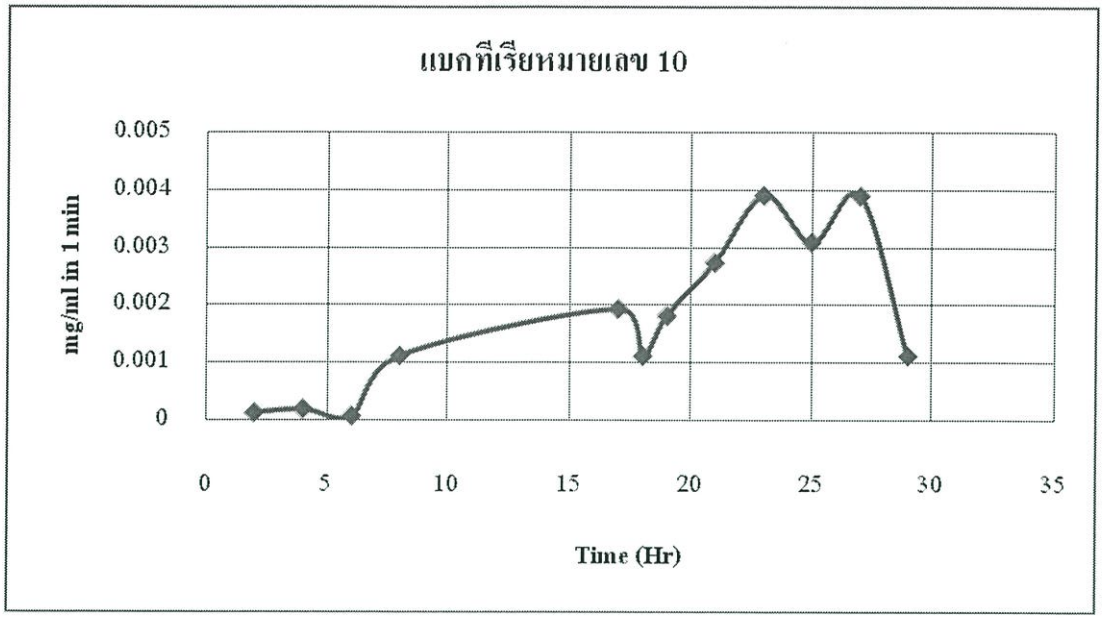
นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 4 ไอโซเลท ได้แก่เชื้อหมายเลข 8 10 16 และ 21 มาทำการเพาะเลี้ยงอาหารเหลว (NB + CMC) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 140 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ทำการแยกส่วนใสของสารละลายที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง ซึ่งส่วนใสที่แยกได้คือเอนไซม์ที่แบคทีเรียผลิตออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) ทำการบ่มเอนไซม์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับ 1% carboxy methyl cellulose (CMC) ใน 0.05 M phosphate buffer pH 7.0 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาทีจากนั้นจึงวัดการทำงานของเอนไซม์จากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยเติม Dinitrosalicylic acid (DNS) reagent (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาการเกิดสีด้วยการทำให้เย็นทันทีและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยเทียบกับค่ากลูโคสจากกราฟมาตรฐานและคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (รูปที่ 4.12, 4.13, 4.14 และ 4.15)

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธี DNS reagent ที่มีค่า enzyme activity สูงที่สุดของทั้ง4 เอนไซม์

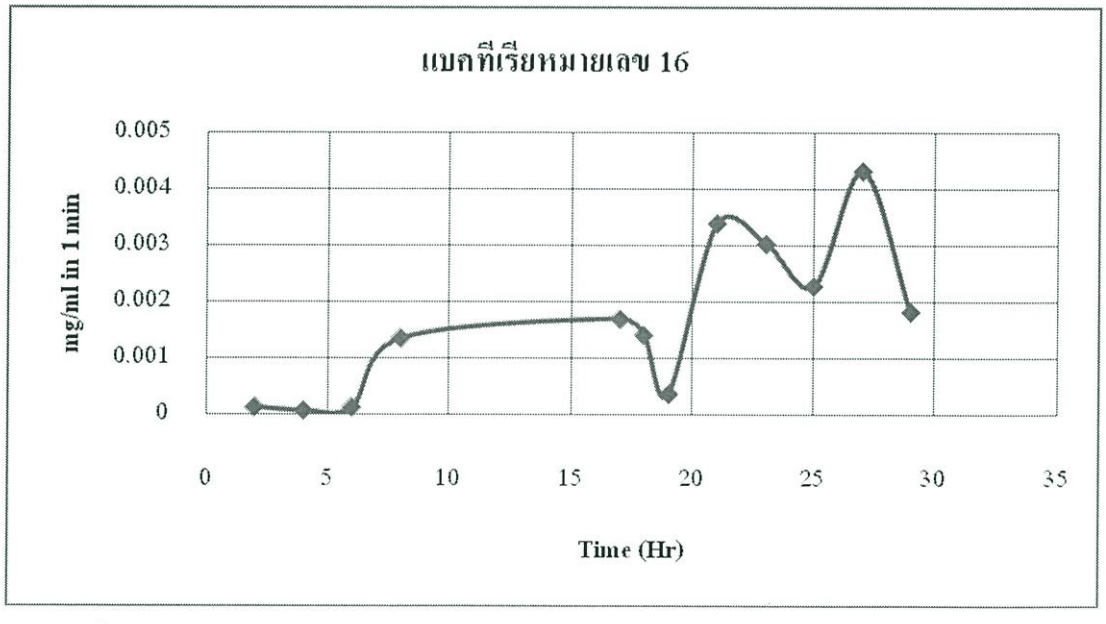
หมายเลขเอนไซม์	enzyme activity (U/ml)
เอนไซม์หมายเลข 8	0.00367
เอนไซม์หมายเลข 10 (ชั่วโมงที่ 23 และ 27)	0.00389
เอนไซม์หมายเลข 16	0.00431
เอนไซม์หมายเลข 21	0.00349



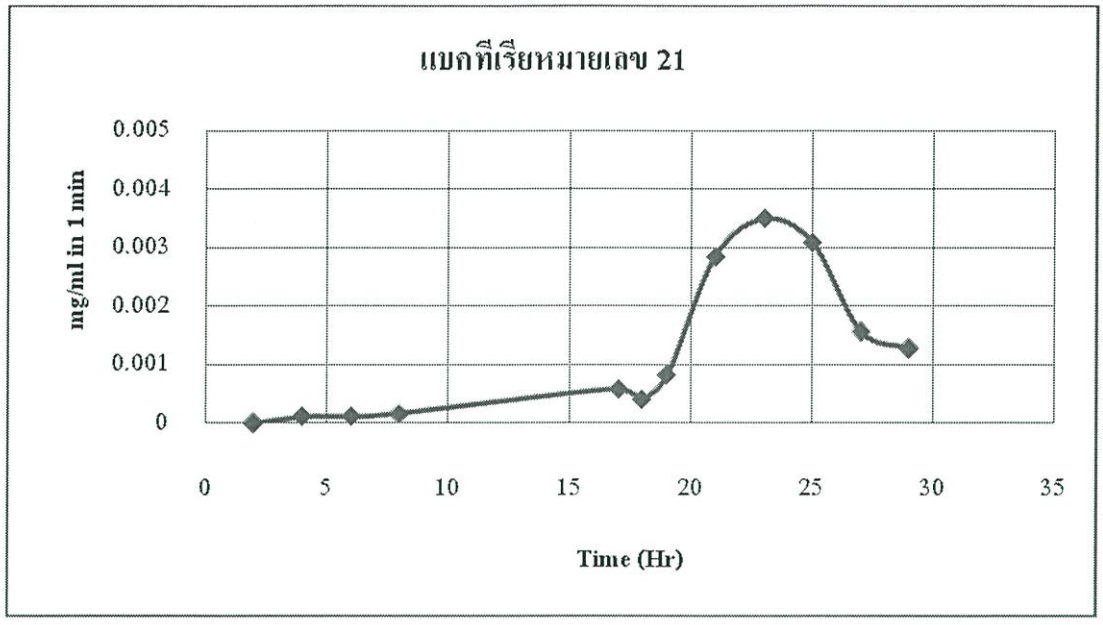
รูปที่ 4.12 กราฟแสดงประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธี DNS reagent ของแบคทีเรียหมายเลข 8



รูปที่ 4.13 กราฟแสดงประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธี DNS reagent ของแบคทีเรียหมายเลข 10



รูปที่ 4.14 กราฟแสดงประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธี DNS reagent ของแบคทีเรียหมายเลข 16



รูปที่ 4.15 กราฟแสดงประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธี DNS reagent ของแบคทีเรียหมายเลข 21

4.4.2 การทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธี filter paper assay

นำเอนไซม์ 4 หมายเลข ที่ทราบระยะเวลาที่ดีที่สุดที่ให้ประสิทธิภาพ จากการทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธี DNS reagentผลแสดงได้ดังนี้

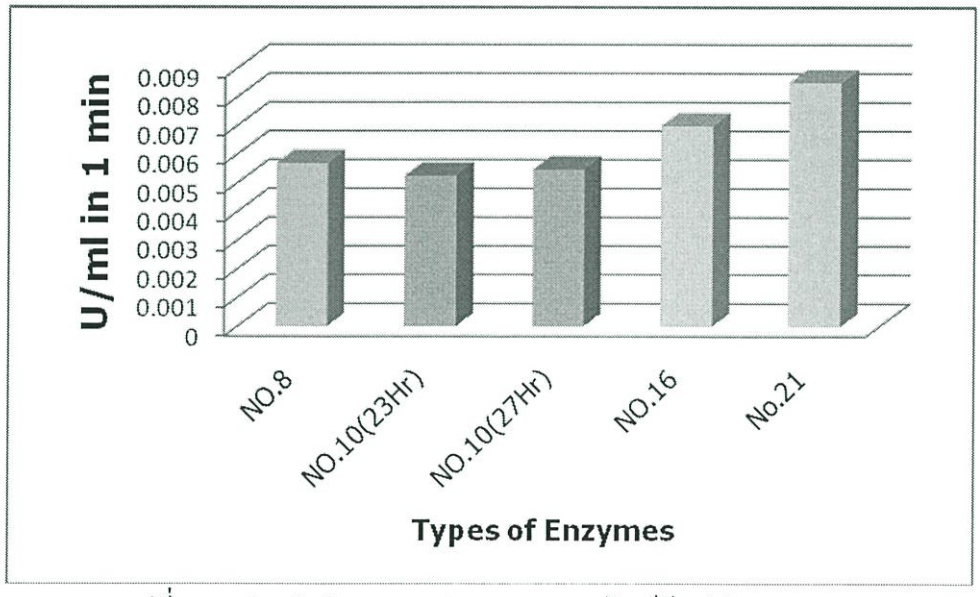
ตารางที่ 4.5 ระยะเวลาที่ให้ประสิทธิภาพสูงที่สุดจากการทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธี DNS reagentของเอนไซม์ทั้ง 4 เอนไซม์

หมายเลขเอนไซม์	ระยะเวลาที่ให้ประสิทธิภาพสูงที่สุด (ชั่วโมง)
เอนไซม์หมายเลข 8	25
เอนไซม์หมายเลข 10	23 และ27
เอนไซม์หมายเลข 16	27
เอนไซม์หมายเลข 21	23

นำเอนไซม์แต่ละหมายเลขมาปริมาตรอย่างละ 0.5 มิลลิลิตร กับกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 0.5 มิลลิกรัม และ 1% carboxy methyl cellulose (CMC) ใน 0.05 M phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที และทำชุดควบคุมเช่นดังกล่าวแต่ทำการไม่บ่มเอนไซม์ วัดการทำงานของเอนไซม์จากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยเติม Dinitrosalicylic acid (DNS) reagent ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาการเกิดสีด้วยการทำให้เย็นทันทีและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยเทียบกับค่ากลูโคสจากกราฟมาตรฐานและคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส
(รูปที่ 4.16)

ตารางที่ 4.6 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธี filter paper assay ที่มีค่า enzyme activity สูงที่สุดของทั้ง 4 เอนไซม์

หมายเลขเอนไซม์	enzyme activity (U/ml)
เอนไซม์หมายเลข 8	0.00569
เอนไซม์หมายเลข 10 ชั่วโมงที่ 23	0.00525
เอนไซม์หมายเลข 10 ชั่วโมงที่ 27	0.00547
เอนไซม์หมายเลข 16	0.00697
เอนไซม์หมายเลข 21	0.00849



รูปที่ 4.16 ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธี filter paper assay

การอภิปรายผลการทดลอง

จากการทดลองในครั้งนี้พบว่าการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้จากมูลวัวสามารถทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งสิ้น 4 ไอโซเลท เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลทมาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสด้วย congo red test วิธีการนี้ทำได้สะดวกอ่านผลได้อย่างรวดเร็วและสีย้อมมีความคงทนจากงานวิจัยนี้พบว่าแบคทีเรียที่ให้ผลเกิดบริเวณโซนใสต่อบริเวณของโคโลนี กว้างที่สุดคือ หมายเลข 21 โดยมีอัตราความกว้าง 4 เซนติเมตร ซึ่งมีอัตราความกว้างที่ใกล้เคียงเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ ทิพวรรณ แตงสวน (2553) ที่ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากมูลสุกรพบว่าเชื้อ SD6R1C79 มีค่าอัตราความกว้างบริเวณโซนใสต่อบริเวณของโคโลนีเท่ากับ 3.88 เซนติเมตร และใกล้เคียงกับงานวิจัยของเพชรลดาปั้นหยาและกำไล เลาหพัฒนาเลิศ (2556)ที่คัดกรองและคัดแยกจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสอะไมเลสและเพคติเนสจากกากมันสำปะหลังสด พบว่าไอโซเลท CASP-RSU M01 และ CASP-RSU M02 มีอัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีมากกกว่า 3 เซนติเมตร อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความไวต่อวิธีทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ต่างกันการทดสอบด้วย congo red test เป็นวิธีการตรวจสอบเบื้องต้นซึ่งจะต้องมีการวิเคราะห์ค่าการทำงานของเอนไซม์ของเชื้อในขั้นต่อไป

การทดสอบเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสด้วยวิธี DNS reagent เป็นวิธีการวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดจากการย่อยสลายเซลลูโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการวัดปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสโดยบ่มเอนไซม์กับ 1% CMC ใน 0.05 M phosphate buffer pH 7.0 จากการทดลองพบว่าแบคทีเรียหมายเลข 16 มี enzyme activity สูงกว่าไอโซเลทอื่นโดยมีค่าเท่ากับ 0.00431 U/ml ซึ่งค่าที่ได้ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับศศิธร ไกรฤทธิชัย (2552)ที่ทำการวิจัยเกี่ยวกับการคัดแยกและคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อยสลายใบไม้พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท CM12 ให้ผลของ enzyme activity สูงถึง 42.60 ± 0.1 U/ml

ส่วนการทดสอบแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสด้วยวิธี filter paper เป็นการทดสอบเพื่อหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดจากการย่อยสลายเซลลูโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกันกับ DNS reagent เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากเนื่องจากกระดาษกรองสามารถเตรียมได้ง่าย วิธีการทดสอบคือบ่มเอนไซม์กับกระดาษกรองเบอร์ 1และ 1% CMC ใน 0.05 M phosphate buffer pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที วัดการทำงานของเอนไซม์จากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยเติม Dinitrosalicylic acid (DNS) reagentต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการทำให้เย็นทันทีและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร จากการทดลองพบว่า แบคทีเรียหมายเลข 21 สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุดที่ชั่วโมง 23 โดยมีค่าเท่ากับ 0.00849 U/ml ซึ่งมีค่าสูงเมื่อเทียบกับงานวิจัยของ เชาวฤทธิ์ โสดากุล และวีรยุทธ เสริฐสูงเนิน (2550) พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ v_7 ได้จากการคัดเลือกจากมูลวัว

เพื่อทดสอบระสิทธิภาพการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดในชั่วโมงที่ 15 โดยมีค่าเท่ากับ 0.0000983U/ml ทั้งนี้การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์ขึ้นกับหลายปัจจัย ได้แก่ปริมาณเชื้อแหล่งคาร์บอน pH อุณหภูมิเป็นต้น

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการวิจัยการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากตัวอย่าง มูลวัว ฟาร์มสัตว์เลี้ยงและวิจัย คณะเทคโนโลยีการเกษตรสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง มาเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วย CMC เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งปัจจัยที่ศึกษาได้แก่ การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะแก่การบ่มเชื้อสำหรับนำมาสกัดเอนไซม์

จากการทดลองความกว้างของวงใสจากการบ่มเชื้อแบคทีเรีย 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เชื้อหมายเลข 21 มีขนาดความกว้างของอัตราส่วนบริเวณโซนใสต่อบริเวณของโคโลนีกว้างที่สุด 4.0 เซนติเมตร น้อยที่สุดคือหมายเลข 16 ขนาดอัตราส่วนความกว้างของโซนใสต่อบริเวณของโคโลนีคือ 1.63 เซนติเมตร โดยทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธี DNS reagent ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงที่สุดคือ เอนไซม์หมายเลข 16 ได้ 0.00431 U/ml จากชั่วโมงที่ 27 แต่การทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธี filter paper assay ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงที่สุดคือ เอนไซม์หมายเลข 21 ได้ 0.00849U/ml จากชั่วโมงที่ 23

5.2 ข้อเสนอแนะ

การผลิตเอนไซม์โดยเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากการทดลองนี้ ในขั้นต่อๆ ไปควรที่จะศึกษาเชื้อแบคทีเรียอย่างละเอียดหากมีเครื่องมือที่เหมาะสม และศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ เช่น การหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์ ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง รวมไปถึงระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น หลังจากศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์แล้วยังควรศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส โดยอาจมีการแยกให้เอนไซม์บริสุทธิ์เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบและกลไกการทำงานของเอนไซม์และทำการศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสให้แน่ชัด เพื่อให้ง่ายต่อนำแบคทีเรียไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ต่อ เช่น นำเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้มาผลิตเอทานอล หรือพลังงานเชื้อเพลิงทดแทน

บรรณานุกรม

กระทรวงพลังงาน. (2555). *โครงการศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสเชิงพาณิชย์*.[online] Available: http://webkc.dede.go.th/webmax/sites/default/files/Final%20Report.pdf (11/11/2015)

เชาวฤทธิ์ โสดากุล และวีรยุทธ เสริฐสูงเนิน.(2550).*การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสโดยจุลินทรีย์จากมูลเพื่อผลิตอาหารสัตว์*. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังกรุงเทพมหานคร.

ทิพวรรณแตงสวน.(2553).*การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากมูลสุกร*. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังกรุงเทพมหานคร.

เทอดชัยเวียรศิลป์. (2548). *โภชนศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง*.มหาวิทยาลัยเชียงใหม่เชียงใหม่.

ศศิธร ไกรฤทธิชัย. (2552). *การแยกและการคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อการย่อยสลายใบไม้*. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่.

ดุษฎี สิยพรรณพงศ์, ศุจิมน ตันวิเชียร, จิตติมา มานะกิจ, ดวงรัตน์ ชูวิสิฐกุล.(2546). *การสกัดและประเมินคุณลักษณะของเซลลูโลสจากชานอ้อย ผักตบชวา และธูปฤษี*. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร.

พรเทพ ถนนแก้ว. (2538). *ภาวะเหมาะสมของการผลิตเซลลูเลสจากเชื้อราที่คัดแยกจากบริเวณปลูกป่าศรนารายณ์*. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยกรุงเทพมหานคร.

พิจิตราตั้งเขื่อนขันธ์, รสรินทร์รุจนานนท์และอัญชลีอานาทสมบูรณ์. (2548). *การคัดเลือกเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากวุ้นมะพร้าวที่เป็นเศษเหลือทิ้งจากโรงงาน*. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังกรุงเทพมหานคร.

เพชรลดาปั้นหยา และกำไล เลาหพัฒนาเลิศ.(2556).*การคัดกรองและคัดแยกจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสอะไมเลสและเพคติเนสจากกากมันสำปะหลังสด*.มหาวิทยาลัยรังสิตกรุงเทพมหานคร.

เมธาวรรณพัฒน์. (2529). *โภชนศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง*.มหาวิทยาลัยขอนแก่นขอนแก่น.

รัชราภาละวงค์สมบูรณ์อนันตลาโภชัย และมาโมรุวากายามา. (2557).*การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียที่แยกจากกระเพาะหมักของวัว*.มหาวิทยาลัยขอนแก่นขอนแก่น.

Alexander, M. (1967). *Introduction to soil microbiology. Toppan Printing.* Co(S) Pte. Ltd. Singapore.

Anonymous 1. (2008). *Cellulose structure.* [Online].Available: http://www.chemistryland.com/ElementarySchool/BuildingBlocks/BuildingOrganic.htm(06/10/2015)

Anonymous 2. (2007). *Mechanism of cellulose hydrolysis*. [Online]. Available: http// www.upload.wikimedia.org/wikipedia/en/thumb/ b/be/Types_of_Cellulase2.png (06/10/2015)

Anonymous 4. (2008). *Price of cellulose*. [Online]. Available http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail (06/10/2015)

Bhat, M. K. (2000). *Cellulases and related ebzymes in biotechnology*. BiotechnologyAdvances.

Bhat, S. (1997). *Cellulase degrading enzymes and their potential industrial application*. Biotechol.Adv.

Fan, L. T. and Lee, Y. H. (1983*). Kinetc studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulosederivation of mechanistic uinetic model Biotech.*Biotechnology and Bioengineering.

Goksoyr, J. and Eriksen, J. (1980). *Cellulase in economic microbiology. Academic Press.*New York.

Klysov, AA. (1990). *Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation. Biochemistry.*

Kumaran, P.T.K. (2012). *Cellulase Production by Bacillus subtilis isolated from Cow Dung.*

Mandel, M. and Elwyn, T.R.(1957). *Inducation of cellulase in Trichoderma virideas influenced by carbon sources and metals.*

Mawadza, C., Rahni, H., Zvauya, R. and Bo, M. (2000). *Purification and characterization of cellulases produced by two* ***Bacillus strains.***

Mohamed, F.E., Toshinori, N., Jun, W. and Kenji, K. (2012). *Isolation and Characterization of Cellulose-decomposing Bacteria Inhabiting Sawdust and Coffee Residue Composts.* Microbes Environ.

Sengbusch, P.V. (2003). *Biomolecules.* [Online]. Available: http://61.19.151.188/scimath /biomolecules/chapter2_4.html (16/10/2015)

tulyaku. (2014). เรื่องของขี้วัว [online]. Available: http://tulyakul.blogspot.com/2014/05/ blog-post_20.html (06/11/2015)

White, A.R. (1982). *Visualization of cellulase and cellulose degradation. In cellulose andother natural polymer systems biogenesis, structure and degradation*. PlenumPress,NewYork.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrent Agar (NA)

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
CMC (carboxymethy Cellulose)	10.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลาย CMC (carboxymethy Cellulose) อาหารแข็งนิวเตรียนต์สำเร็จรูปและวุ้นลงในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Nutrent borth (NB)

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
CMC (carboxymethy Cellulose)	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลาย CMC (carboxymethy Cellulose) อาหารเหลวนิวเตรียนต์สำเร็จรูปลงในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. สารละลายคองโกเรด (Congo red) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1

ประกอบด้วย

คองโก เรด	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ละลายคองโก เรด 0.1 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นคนสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน

2. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 1 โมลาร์

ประกอบด้วย

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	58.44	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 58.44 กรัม ในน้ำกลั่น 1000.0 มิลลิลิตร จากนั้นคนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

3. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล

ประกอบด้วย

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	85.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 85.0 กรัม ในน้ำกลั่น 1000.0 มิลลิลิตร จากนั้นคนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

4. สารละลาย Dintrosalicylic Acid (DNS)

ประกอบด้วย(ร้อยละ)ในน้ำกลั่น

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

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในน้ำกลั่นตามปริมาตรที่ต้องการ แล้วจึงเติมสารละลายอื่น ๆ ลงในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ บรรจุใส่ขวดสีชาแล้วเก็บไว้ในที่มืด

5. การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) (ตามวิธีของ ปฏิพันธ์ , 2546)

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการ และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

สารละลาย A: 0.05 M dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 7.80 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B: 0.05 M monobasic sodium phosphate ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 8.90 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

เตรียมบัฟเฟอร์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ได้ดังตาราง

พีเอช	A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)
6.3	24.0	76.0
6.5	33.4	66.6
6.7	44.3	55.7
6.8	50.0	50.0
6.9	55.7	44.3
7.0	61.3	38.7
7.2	71.5	28.5
7.4	79.9	20.1
7.5	83.4	16.6
7.8	90.9	9.1

6. 1% carboxy methyl cellulose (CMC) ใน 0.05 M phosphate buffer pH 7.0 ประกอบด้วย

carboxy methyl cellulose (CMC)	1.0	กรัม
0.05 M phosphate buffer pH 7.0	100.0	มิลลิลิตร

ผสม CMC 1.0 กรัม กับ 0.05 M phosphate buffer pH 7.0 80 มิลลิลิตร อุ่นให้ CMC ละลายจนหมดเติม 0.05 M phosphate buffer pH 7.0 ให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

การศึกษารูปร่างแบคทีเรียโดยการย้อมสี

อุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์
2. สไลด์ลวดเขี่ยเชื้อ
3. ตะเกียงแอลกอฮอล์
4. กระดาษเช็ดเลนส์
5. ปากคีบ
6. ตะแกรงรองสไลด์

สารเคมี

1. สีย้อม Crystal violet
2. สีย้อม Safranin
3. แอลกอฮอล์ 95%
4. น้ำยาแกรมไอโอดีน

วิธีทำ

1. หยดสี Crystal violet ลงบนสไลด์ให้ท่วมรอยสเมียร์ของเชื้อแบคทีเรีย ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำยาแกรมไอโอดีน
2. หยดน้ำยาแกรมไอโอดีนให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างน้ำยาแกรมไอโอดีนด้วยน้ำ และล้างอีกครั้งด้วยแอลกอฮอล์ จนน้ำยาที่ล้างไม่มีสีติด
3. ย้อมทับด้วยสี Safranin ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำ ล่อยให้สไลด์แห้งแล้วตรวจผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ขยาย 100 เท่า

ภาคผนวก ง

วิธีทดสอบและการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Dinitrosalicylic Acid Method (DNS)

1.1 วิธีวิเคราะห์

1.1.1 ปิเปตตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

1.1.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

1.1.3 เติมสารละลาย DNS 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาทีแล้วหยุดปฏิกิริยาการเกิดสีด้วยการทำให้เย็นทันที

1.1.4 เติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

1.1.5 ทำแบลงค์โดยการใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง ดำเนินการเหมือนการทดลองข้างต้น

1.1.6 นำค่า OD ที่ได้เทียบหาค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์กับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

1.2 การทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

1.2.1 ชั่งน้ำตาลกลูโคส 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตรโดยใช้ขวดปรับปริมาตร

1.2.2 เจือจางให้ได้สารละลายน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้น 0.1-0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

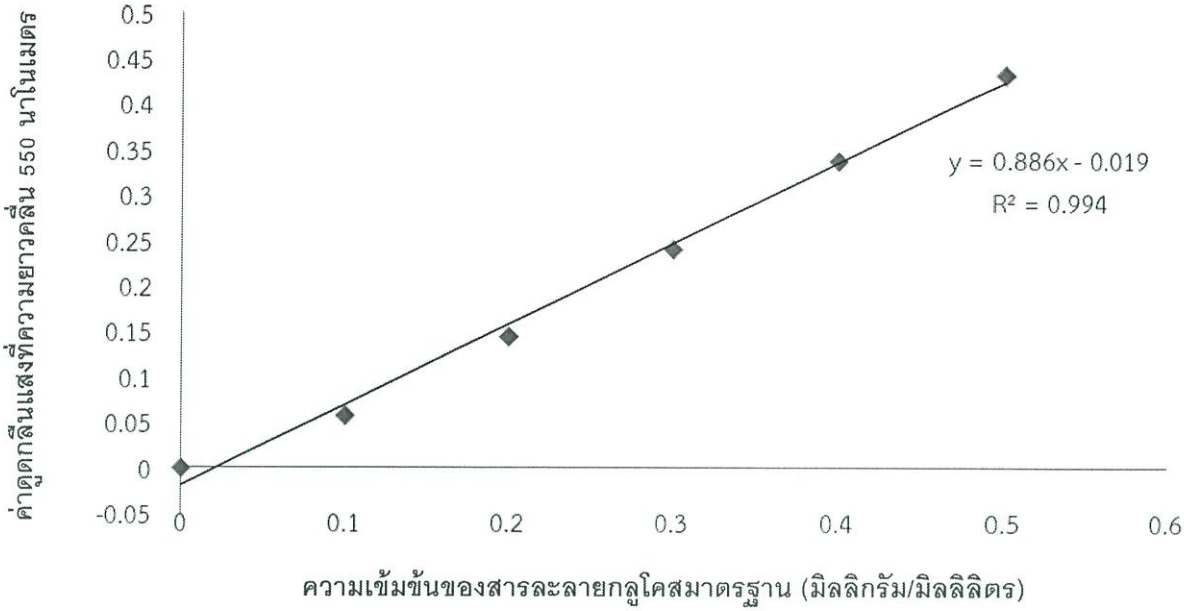
1.2.3 ปิเปตสารละลายน้ำตาลกลูโคสจากข้อ 1.1.2 มาความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง (ใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตรเป็นแบลงค์)

1.2.4 เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที

1.2.5 ทำให้เย็นทันทีและปรับปริมาตรให้ได้ 6 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

1.2.6 เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

1.2.7 นำข้อมูลไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลกลูโคส



รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

1.3 การคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

$$\text{ยูนิต/มิลลิกรัม} = \frac{\text{มิลลิกรัมของกลูโคส} \times 1000 \times \text{จำนวนเท่าการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลของกลูโคส} \times \text{ระยะเวลาการบ่ม} \times \text{ปริมาตรสารละลายเอนไซม์}}$$

2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี FPase activity คำนวณ ตามหลัก The International Union of Biochemistry

2.1 วิธีวิเคราะห์

2.1.1 ปิเปตตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.1.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

2.1.3 เติมสารละลาย DNS 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาทีแล้วหยุดปฏิกิริยาการเกิดสีด้วยการทำให้เย็นทันที

2.1.4 เติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

2.1.5 ทำแบลงค์โดยการใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง ดำเนินการเหมือนการทดลองข้างต้น

2.1.6 นำค่า OD ที่ได้เทียบหาค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์กับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

2.2 การคำนวณค่ากิจกรรมของ FPase activity

1 enzyme unit = 1 µmol ของ Substrate ถูกย่อยภายใน 1 นาที

1 µmol ของกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมาภายใน 1 วินาที

0.18 mg กลูโคสถูกปล่อยภายใน 1 นาที

1 mg ของกลูโคสที่ถูกปล่อย ใน 60 นาที 1 ยูนิต $= \frac{1}{0.18x60} = 0.0925$

ถ้า ปล่อยกลูโคส X mg ใน 60 นาที จะมีค่า 0.0925 x X ยูนิต

0.5 ml = 0.0925 x X mg ของกลูโคส

1 ml = $0.0925 \frac{0.0925}{0.5}$ x X mg ของกลูโคส

1 ยูนิต/ml = 0.185 x X mg ของกลูโคส