สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส

(Screening for Cellulolytic Bacteria)

นางสาวสุฤทัย ล้ำประเสริฐ

รหัสประจำตัว 40044486

T096876

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2543

ปพ.
ศส671
2543

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....96876
วัน เดือน ปี.....5 JUN 2000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุฤทัย ล้ำประเสริฐ, 2543 : การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์อัชชา จินดาประเสริฐ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : อาจารย์นิตยา พิระภัทรุ่งสุริยา

การเก็บรวบรวมและคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากกระเพาะส่วนต้นของวัว และมูลวัว โดยได้ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีองค์ประกอบของเซลลูโลส 3 ชนิด คือ rumen fluid cellulose agar (RFCA), Petterson's media และ Mc belt's ammonium sulfate solution ซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่รวบรวมและคัดแยกได้มีทั้งสิ้น 60 สายพันธุ์ ในจำนวนนี้มีเพียง 13 สายพันธุ์ ที่สามารถมองเห็นลักษณะของโคโลนีใส (clear zone) ได้ชัดเจนเมื่อทดสอบด้วย Congo red โดยสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดมาจากมูลวัว คือ สายพันธุ์ที่ 45 และ 50 และเมื่อนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ มาศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส โดยเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี Carboxymethyl cellulose (CMC) 1% เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่ามีค่า CMCase เท่ากับ 0.223 และ 0.173 Unit/ml ตามลำดับ จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม คาดว่าสายพันธุ์ที่ 45 และ 50 เป็นเชื้อในสกุล *Staphylococcus sp.* และแบคทีเรียดังกล่าวสามารถย่อยสลายหญ้าขนที่ผ่านการเตรียมตัวอย่างซึ่งเป็นวัตถุดิบธรรมชาติได้ดีกว่าไม่ผ่านการเตรียมตัวอย่าง

.....สุฤทัย ล้ำประเสริฐ.....	.....อัชชา จินดาประเสริฐ.....
ลายมือชื่อนักศึกษา	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
.....	10 พ.ค. 44
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	วัน เดือน ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้เนื่องมาจากความกรุณาของ อาจารย์อัชชา จินดาประเสริฐ ที่ได้ให้เกียรติเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ซึ่งให้ความรู้และคำแนะนำอันมีค่าและเป็นประโยชน์ ตลอดจนช่วยตรวจทานและแก้ไขปัญหาพิเศษฉบับนี้จนสมบูรณ์ ข้าพเจ้ารู้สึกทราบซึ้งและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์นิตยา พิระภัทรุ่งสุริยา ที่ให้เกียรติเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ซึ่งให้ความรู้และคำแนะนำอันเป็นประโยชน์ในการทำปัญหาพิเศษฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.ศศิวิมล ชื่นอิ่ม ที่ให้เกียรติเป็นคณะกรรมการในการสอบปัญหาพิเศษ และให้ความรู้ คำแนะนำอันเป็นประโยชน์ในการทำปัญหาพิเศษฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณสุธีรวัฒน์ พันธุ์มาลัย ที่กรุณาเสียสละเวลาในการช่วยเก็บตัวอย่าง รวมทั้งให้ความรู้และข้อเสนอแนะต่างๆ อันเป็นประโยชน์

ขอขอบคุณ คุณอริสรา รัตนาชาตรี ที่ช่วยในการเตรียมอาหารสำหรับการจัดจำแนกเชื้อและกำลังใจที่ให้มาตลอด

ขอขอบคุณสำหรับความช่วยเหลือ และกำลังใจ จากพี่ เพื่อนๆ และน้องๆ ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตรทุกๆคน

ท้ายสุดนี้ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา พี่ชาย ที่คอยให้การสนับสนุน และเป็นกำลังใจเสมอมา ทำให้การทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้สามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

สุฤทัย ล้ำประเสริฐ

6 เมษายน 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบาญ	ค
สารบาญตาราง	ง
สารบาญภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	4
1. เซลลูโลส	4
1.1 ลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลส	4
1.2 การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส	8
1.3 ประโยชน์ของเซลลูโลส	9
2. เอนไซม์เซลลูเลส	10
2.1 ระบบเอนไซม์เซลลูเลส	11
2.2 สมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส	12
2.3 ประโยชน์ของเอนไซม์เซลลูเลส	13
3. จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส	13
4. จุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน	16
4.1 แบคทีเรีย	17
4.2 โปรโตซัว	19
4.3 รา	23
5. การแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสจากธรรมชาติ	23
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	26
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	33
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	47
เอกสารอ้างอิง	49
ภาคผนวก ก	51
ภาคผนวก ข	58
ประวัติผู้เขียน	60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบาญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้	14
2	ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสในกระเพาะของสัตว์เคี้ยวเอื้อง	15
3	ลักษณะและรายละเอียดอื่น ๆ ของแบคทีเรียชนิดต่างใน rumen	20
4	แสดงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด จากอาหาร 3 สูตร	33
5	ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส จาก Rumen และมูลวัว	35
6	แสดงการเกิด/ความชัดของบริเวณวงใส (clear zone) ของเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ	40
7	แสดงประสิทธิภาพของเอนไซม์โดยการย่อยสลาย carboxymethyl cellulose (CMC) ที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้	41
8	แสดงผลการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย	42
9	แสดงประสิทธิภาพของเอนไซม์โดยการย่อยสลาย carboxymethyl cellulose (CMC) ที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้	43
10	แสดงกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูโลสของเชื้อสายพันธุ์ที่ 45 และ 50 ในการย่อยวัตถุดิบจากธรรมชาติ เป็นเวลา 7 วัน	46
11	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ของสารละลายกลูโคส	58
12	แสดงกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 45 ที่คัดเลือกได้จากกระเพาะส่วนต้นของวัว และมูลวัว	59
13	แสดงกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 50 ที่คัดเลือกได้จากกระเพาะส่วนต้นของวัว และมูลวัว	59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบาญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงสูตรโมเลกุลและลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลส	5
2	โครงสร้างเซลลูโลสที่พบในผนังเซลล์ของพืชทั่วไป	6
3	แสดงการจัดเรียงตัวของโมเลกุลของผนังเซลล์พืช	7
4	การใช้ประโยชน์จากเซลลูโลสด้วยการย่อยสลายน้ำตาล	10
5	ขั้นตอนการย่อยสลายเซลลูโลส	12
6	วิธีการเก็บตัวอย่างจากกระเพาะส่วนต้นของวัว	34
7	แสดงตัวอย่าง rumen fluid (ก) และมูลวัว (ข)	35
8	ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร CMC agar เป็นเวลา 3 วัน	39
9	กราฟแสดงประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ เป็นเวลา 5 วัน	41
10	กราฟแสดงประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้	44
11	แสดงหญ้าขนที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเตรียมตัวอย่าง	45
12	กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ของสารละลายน้ำตาลกลูโคส	58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

เซลลูโลส (Cellulose) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ พบมากที่สุดในพืช เซลลูโลสเป็นโมเลกุลที่ไม่มีกิ่งก้านสาขา ประกอบด้วยหน่วยกลูโคสต่อกันเป็นสายยาว เชื่อมกันที่ตำแหน่ง β-1,4 ของคาร์บอน และไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ที่มีอยู่ในกระเพาะลำไส้ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เซลลูโลสมีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 50,000-500,000 โมเลกุล โมเลกุลของเซลลูโลสเรียงขนานกันอยู่เป็นมัดๆ หรือที่เรียกกันว่า ไฟบริล (fibril) ซึ่งจับกันอยู่ด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) และไม่ละลายน้ำ เซลลูโลสเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์พืช ต้นพืชจะมีเซลลูโลสประมาณ 40-60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพืชตายลงจะเกิดการย่อยสลาย โดยเปลี่ยนเซลลูโลสไปเป็นสารประกอบอินทรีย์ และอนินทรีย์ต่างๆ (นวลพรรณ, 2524)

แหล่งที่สำคัญของเซลลูโลสนอกจากจะได้จากพืชตามธรรมชาติแล้ว ยังได้จากอุตสาหกรรมการแปรรูปพืช และอุตสาหกรรมอื่นๆอีก เช่น อุตสาหกรรมแปรรูปไม้ อุตสาหกรรมเส้นใย อุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ ขยะเทศบาล รวมไปถึงวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งจะเห็นว่าส่วนที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมต่างๆนี้ ยังสามารถนำไปใช้เป็นประโยชน์ได้อีกมาก (พรเทพ, 2538)

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสนับว่ามีความสำคัญในการย่อยสลายเซลลูโลสมาก โดยจุลินทรีย์พวกนี้มักอยู่ในกลุ่มของเชื้อรา แบคทีเรีย แอคติโนมัยสีท (พรเทพ, 2538) ซึ่งจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส สามารถพบได้ในธรรมชาติตามแหล่งต่างๆที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ ซึ่งพบว่าในกระเพาะของสัตว์เคี้ยวเอื้องมีจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้

จุลินทรีย์ในกระเพาะของสัตว์เคี้ยวเอื้อง มี 2 จำพวกใหญ่ๆ คือ แบคทีเรีย คือ ciliated protozoa พวกอื่นก็อาจจะมีอยู่บ้าง แต่ก็เป็นจำนวนน้อย สภาพภายในกระเพาะของสัตว์เคี้ยวเอื้องเป็นสภาพไร้ออกซิเจน ดังนั้นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอยู่จึงเป็นพวก anaerobes หรือ facultative anaerobes โดยสภาพในกระเพาะของสัตว์เคี้ยวเอื้องเหมาะแก่การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์มาก คือ มี pH อยู่ในช่วง 5.5-7.0 และมีอุณหภูมิประมาณ 39-40 องศาเซลเซียส แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสนั้น จะใช้เซลลูโลสโดยมีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเข้าย่อยสลายเซลลูโลส โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้จะมีมากที่สุดในกระเพาะของสัตว์ที่ได้รับอาหารหยาบเป็นหลัก แบคทีเรียชนิดที่สำคัญที่พบในกระเพาะของสัตว์เคี้ยวเอื้อง ได้แก่ *Ruminococcus albus*,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

R. flavefaciens และ *Bacteroides succinogenes* นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียชนิดอื่นๆอีก ซึ่งก็มีส่วนในการย่อยสลายเซลลูโลส แต่ไม่ค่อยพบในกระเพาะของสัตว์เคี้ยวเอื้อง (บุญล้อม, 2527)

จากการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส จะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือ น้ำตาลกลูโคส ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการผลิตแอลกอฮอล์ โปรตีนเซลล์เดียว ไวตามิน กรดอินทรีย์ สารปฏิชีวนะ และเคมีภัณฑ์ต่างๆ โดยผ่านกระบวนการหมัก นอกจากนี้ยังมีการนำเอนไซม์เซลลูเลสไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆอีก เช่น อุตสาหกรรมผลิตยา อุตสาหกรรมผลิตอาหาร อุตสาหกรรมผลิตกระดาษ เป็นต้น (พรเทพ, 2538)

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงได้ทำการคัดเลือกและจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสจากกระเพาะส่วนต้นของวัว และมูลวัว โดยทำการเลี้ยงในอาหาร RFCA Petterson's media และ Mc beth's cellulose ammonium sulfate solution โดยมีองค์ประกอบของเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้แล้วทำการหาประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสของเอนไซม์เซลลูเลส และทำการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียจากเชื้อที่คัดเลือกได้ รวมทั้งศึกษาการย่อยสลายเซลลูโลสของเชื้อแบคทีเรียจากวัตถุดิบธรรมชาติ เพื่อเป็นการเพิ่มคุณค่าของวัตถุดิบเหลือทิ้งจากทางเกษตรต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกและจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้
3. เพื่อศึกษาการย่อยสลายเซลลูโลสของเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้วัตถุดิบธรรมชาติเป็นแหล่งคาร์บอน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส จากกระเพาะส่วนต้นของวัวและมูลวัว และทราบชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้
2. ทราบถึงประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในการย่อยสลายเซลลูโลส
3. สามารถนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ มาใช้ร่วมกับวัตถุดิบธรรมชาติ ในการย่อยสลายเซลลูโลส

ขอบเขตของการศึกษา

การศึกษาครั้งนี้ ทำการคัดเลือกและจำแนกถึงระดับสกุลของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ โดยการเก็บและรวบรวมเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการจากกระเพาะส่วนต้นของวัวและมูลวัว แล้วนำมาทดสอบสมบัติในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส รวมไปถึงความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสจากวัตถุดิบธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

1. เซลลูโลส

1.1 ลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลส

เซลลูโลสเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดพอลีแซคคาไรด์ ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยของดีกลูโคส (D-glucose) ในรูปบีตา-ดี-กลูโคไพราโนส (β-D-glucopyranose) มาเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic linkage) ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 1 กับคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 4 ในโมเลกุล (ภาพที่ 1ก) การจัดเรียงตัวของหน่วยย่อยดี-กลูโคส จะอยู่ในลักษณะ chair form แต่ละโมเลกุลในสายเซลลูโลสจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 3 กับออกซิเจนที่อยู่ในวงแหวนของโมเลกุลถัดไป และเชื่อมต่อระหว่างสายเซลลูโลสที่ขนานกันด้วยพันธะไฮโดรเจน ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 6 กับออกซิเจนที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลของดี-กลูโคสในอีกสายหนึ่ง (ภาพที่ 1ข) จากการจัดเรียงตัวแบบนี้ ทำให้สายเซลลูโลสเรียงตัวขนานซึ่งกันและกันอย่างมีระเบียบเป็นกลุ่มของผลึก (micelles) โดยแต่ละกลุ่มประกอบด้วยโมเลกุลเซลลูโลสประมาณ 100 โมเลกุล มีรูปร่างเป็นแถบหนา กลุ่มเหล่านี้ประมาณ 10 ถึง 20 กลุ่ม จะมาเรียงตัวเป็นโครงสร้างที่ใหญ่ขึ้น เรียกว่า ไมโครไฟบริล (microfibril) ซึ่งสามารถแบ่งโครงสร้างเซลลูโลสในผนังเซลล์พืช ตามการจัดเรียงตัวของไมโครไฟบริลได้ 3 ลักษณะ (พรเทพ, 2538) คือ

ก. Fringe micelles ในไมโครไฟบริล ประกอบด้วยส่วนที่เป็นผลึก (crystalline) และอะมอร์ฟัส (amorphous) (ภาพที่ 2ก)

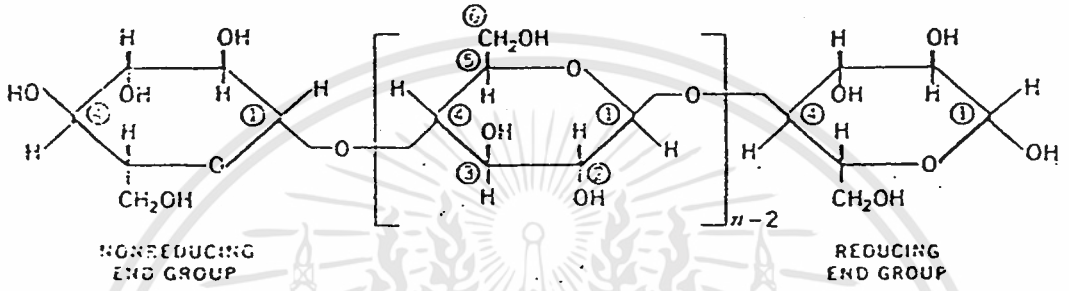
ข. โครงสร้างเซลลูโลสที่ม้วนหรือพับไปมาตามแกนของเส้นใยเซลลูโลส (ภาพที่ 2ข)

ค. โครงสร้างเซลลูโลสที่มีลักษณะเป็นเกลียว (helix) เกิดจากการม้วนไปมาโดยตั้งฉากกับแนวแกน (ภาพที่ 2ค)

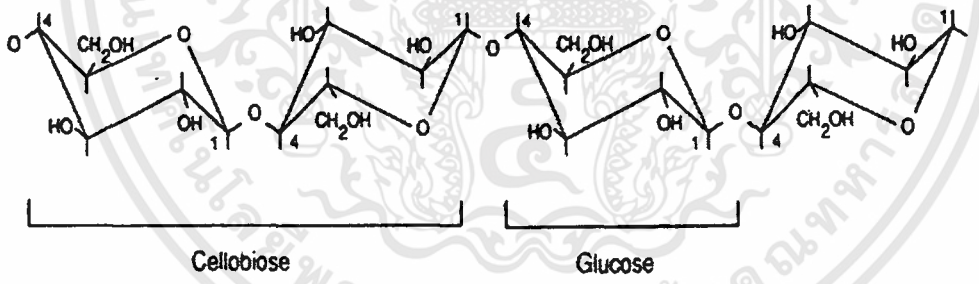
ในธรรมชาติ เซลลูโลสจะอยู่ในรูปของลิกโนเซลลูโลส โดยจะเชื่อมต่ออยู่กับพอลีแซคคาไรด์อื่นๆ เช่น เพคติน เฮมิเซลลูโลส แป้ง และพีโนลิก จากการศึกษาถึงโครงสร้างของเส้นใยเซลลูโลส พบว่าในส่วนของ secondary cell wall จะเป็นส่วนที่พบเซลลูโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก



ข



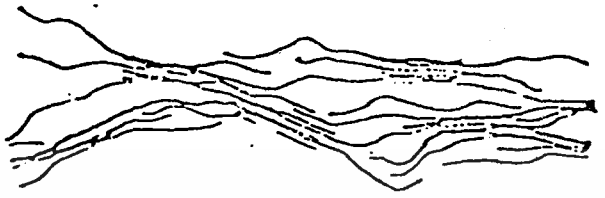
ภาพที่ 1 แสดงสูตรโมเลกุลและลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลส

ก. สูตรโมเลกุล ที่มา : พรเทพ (2538)

ข. ลักษณะโครงสร้าง ที่มา : Beguin and Aubert (1992)

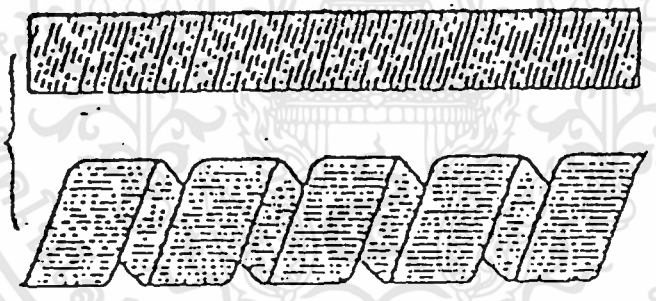
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก



ข

ค



ภาพที่ 2 โครงสร้างเซลลูโลสที่พบในผนังเซลล์ของพืชทั่วไป

ก. Fringe micelles ในไมโครไฟบริล

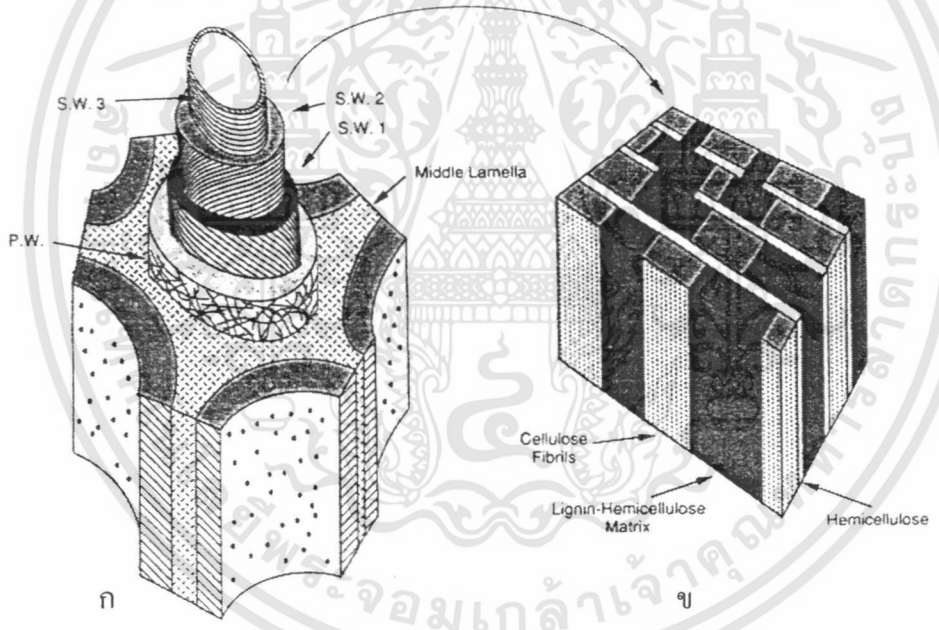
ข. โครงสร้างเซลลูโลสที่ม้วนหรือพับไปมาตามแกนของเส้นใยเซลลูโลส

ค. โครงสร้างเซลลูโลสที่มีลักษณะเป็นริบบิ้นหนา

ที่มา : พรเทพ (2538)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มากที่สุด (ภาพที่ 3) และจะมีปริมาณลดลงในส่วนของ middle lamellaส่วนเฮมิเซลลูโลส และลิกนินจะพบมากในส่วนของ middle lamella และมีปริมาณลดลงในส่วนของ secondary cell wall บริเวณที่มีการจัดเรียงโมเลกุลของเซลลูโลสอย่างเป็นระเบียบสูง เรียกว่า บริเวณคริสตัลลีน ส่วนบริเวณที่มีการจัดเรียงโมเลกุลของเซลลูโลสไม่เป็นระเบียบ หรือเป็นระเบียบน้อยกว่า เรียกว่า บริเวณอะมอร์ฟัส หรือพาราคริสตัลลีน บริเวณคริสตัลลีน จะมีประมาณ 50-90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลือจะเป็นอะมอร์ฟัส แต่ละบริเวณจะแสดงคุณสมบัติในการยอมรับต่อกลไกการเข้าทำปฏิกริยาของเอนไซม์แตกต่างกัน โดยบริเวณอะมอร์ฟัสจะยอมให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกริยาการย่อยสลายได้ง่ายกว่าบริเวณคริสตัลลีน ดังนั้นกลไกการย่อยสลาย จะเกิดขึ้นที่บริเวณอะมอร์ฟัสได้เร็วกว่า และเกิดขึ้นก่อนบริเวณคริสตัสลีน (Lee, et al., 1983)



ภาพที่ 3 แสดงการจัดเรียงตัวของโมเลกุลของผนังเซลล์พืช

ก. ภาพตัดขวางของผนังเซลล์

ข. ความสัมพันธ์ระหว่างลิกนิน เฮมิเซลลลูโลส และ เซลลูโลส

โดย P.W. คือ primary wall

S.W. คือ secondary cell wall

ที่มา : Beguin and Aubert (1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลลูโลสไม่ละลายในน้ำ ในตัวทำละลายอินทรีย์ หรือสารละลายด่างอ่อน แต่ละลายได้ดีในกรด หรือด่างแก่ ดังนั้นสามารถแบ่งชนิดของเซลลูโลสตามลักษณะการละลายในกรด หรือด่างได้เป็น 3 ชนิด (พรเทพ, 2538)

ก. แอลฟา-เซลลูโลส (α-cellulose) เป็นเซลลูโลสที่ไม่ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 17.5 เปอร์เซ็นต์

ข. บีตา-เซลลูโลส (β-cellulose) เป็นเซลลูโลสที่สามารถละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 17.5 เปอร์เซ็นต์

ค. แกมมา-เซลลูโลส (γ-cellulose) เป็นเซลลูโลสที่ละลายได้ดีทั้งในโซเดียมไฮดรอกไซด์ 17.5 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายกรดเจือจาง

1.2 <u>การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส</u>

ในธรรมชาติการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส เกิดโดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์หลายชนิดร่วมกัน ในสภาพที่มีออกซิเจน ผลที่ได้จากการย่อยสลาย จะได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ฮิวมัส ความร้อน และจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น โดยที่ปริมาณการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์จะได้มาจากการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสในสภาพที่เหมาะสม มีการระบายอากาศและอุณหภูมิที่เหมาะสม มีแหล่งอาหารเพียงพอกับการนำไปสร้างพลังงานเพื่อใช้ในระบบเมตาบอลิซึม และการเพิ่มจำนวนเซลล์ ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน การย่อยสลายเซลลูโลส จะได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรเจน เอทธานอล กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก กรดซัคซินิก กรดบิวทีริก และกรดแลคติก เป็นต้น (Alexander, 1961) นอกจากนี้การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส ยังสามารถทำได้โดยวิธีทางเคมี ซึ่งเป็นการย่อยสลายด้วยสารเคมี อาทิเช่น การใช้กรดการย่อยสลายวิธีนี้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะไม่เฉพาะเจาะจง ดังนั้นน้ำตาลกลูโคสบางส่วนที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับกรดต่อไป ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงชนิดอื่น และกรดยังทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ติดมากับเซลลูโลส ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ นอกจากนี้โครงสร้างในส่วนที่เป็นคริสตัลลีน ก็จำเป็นต้องใช้กรดที่มีความเข้มข้น และอุณหภูมิสูงในการย่อยสลายจึงจะได้น้ำตาลกลูโคส ปฏิกิริยาการย่อยจึงเกิดแบบรุนแรง ภาชนะที่ใช้ก็ต้องทนการกัดกร่อน ต้นทุนจึงสูง และกรดที่ถูกทิ้งออกมายังก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมด้วย แต่วิธีนี้ปฏิกิริยาการย่อยสลายจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 15-20 นาที หรือโดยวิธีทางชีวภาพ อาทิเช่น การย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส โดยจะไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ปนมา จึงทำให้ได้น้ำตาลกลูโคสที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ ลักษณะการย่อยจะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ ปฏิกริยาเกิดขึ้นในที่มีอุณหภูมิซึ่งสิ่งมีชีวิตสามารถเจริญเติบโตได้ และปฏิกิริยาที่กิดขึ้นก็ไม่รุนแรง นอกจากนี้ก็ไม่จำเป็นต้องใช้ภาชนะที่ทนทานต่อการกัดกร่อน ต้นทุนจึงต่ำกว่า และยัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม หากแต่วิธีนี้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จะอยู่ในรูปของสารละลายเจือจาง (Goldstein, 1981)

1.3 <u>ประโยชน์ของเซลลูโลส</u> (ปราณี, 2543)

เซลลูโลสซึ่งเป็นของเหลือทิ้งปริมาณมากที่สุดของอุตสาหกรรมเกษตร จึงควรนำมาทำให้เป็นประโยชน์ โดยสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ได้ดังนี้ คือ

1. <u>ใช้เซลลูโลสเป็นอาหารของจุลินทรีย์</u>

การเลือกใช้จุลินทรีย์เข้าสู่อุตสาหกรรมการใช้ประโยชน์จากเซลลูโลสนั้น ได้มีการใช้เซลลูโลสเป็นอาหารโดยตรง หรือจะใช้เซลลูโลสเป็นอาหารโดยอ้อมแก่จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส โดยจุลินทรีย์จะทำการย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเสียก่อน แล้วจะหมักต่อไปเป็นสารอาหารที่ให้ประโยชนสำหรับคน เช่น วิตามิน กรดอะมิโน หรือการใช้ประโยชน์อื่นๆ ตามแผนภูมิภาพที่ 4

2. <u>ใช้เซลลูโลสสำหรับการบริโภค</u>

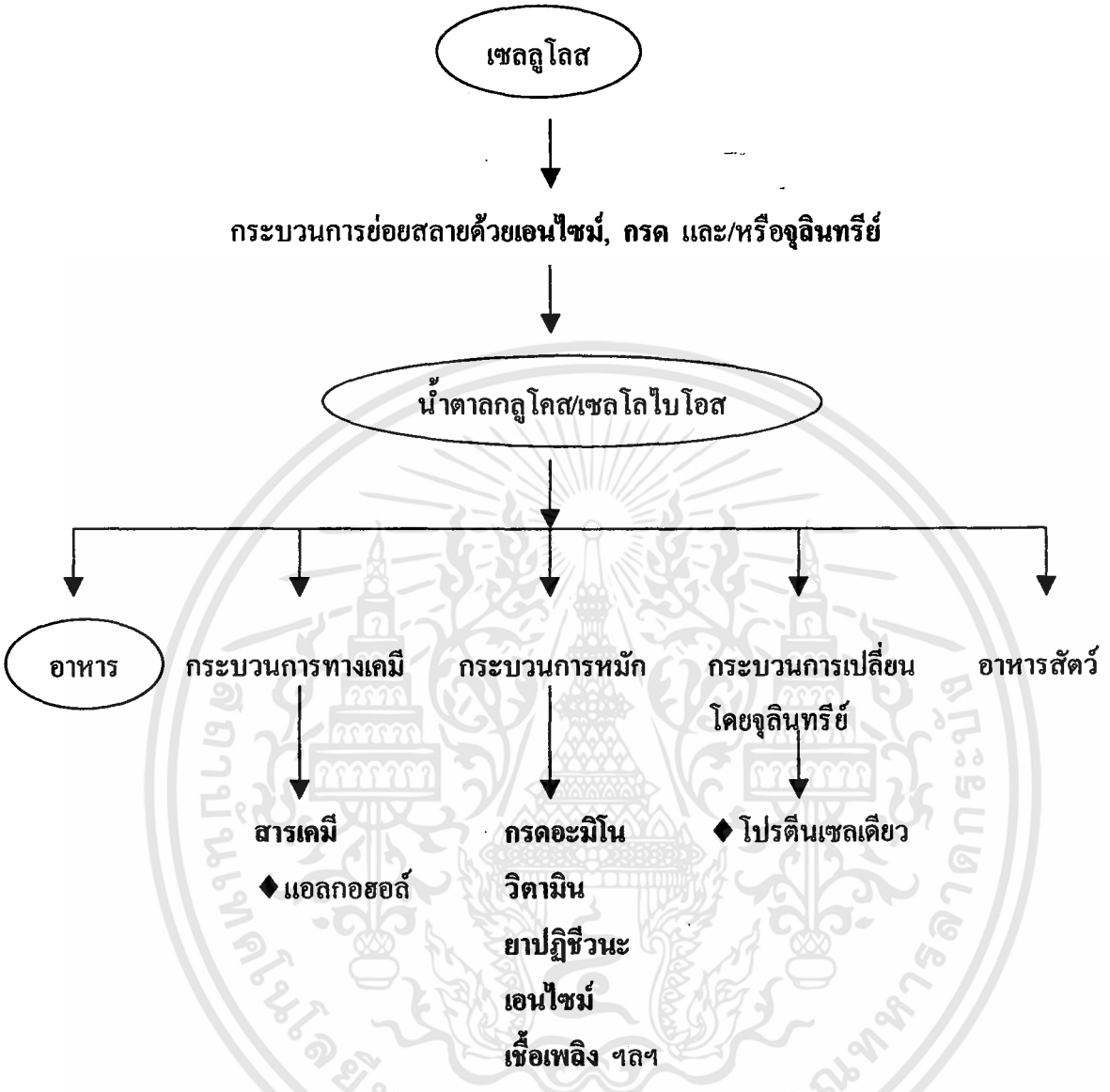
เซลลูโลสให้ประโยชน์ทั้งผู้บริโภคตรง และประโยชน์ช่วยในการแปรรูปอาหาร คือ

1. เซลลูโลส ใช้เป็นอาหารโดยตรง หรือ อาหารเสริมสุขภาพพวกเสริมใยอาหาร (fiber supplement)

2. เซลลูโลส ใช้เป็นสารอาหาร หรือเป็นส่วนประกอบของอาหาร

โดยแหล่งของเซลลูโลส ควรมาจากพืชที่บริโภคได้ และมีความบริสุทธิ์ รวมทั้งพืชที่ไม่ใช่ GMO อีกด้วย ซึ่งในอุตสาหกรรมอาหารได้มีการนำเซลลูโลสมาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหาร เช่น ใช้เป็นสารเพิ่มเนื้อที่ไม่ทำปฏิกิริยา (inert filler) โดยจะใช้ในเนื้อสัตว์ คุกกี้ เนยเทียม ใช้เป็นสารชะลอความเก่า แห้ง (retarding agent) ซึ่งใช้ในการแช่แข็ง เป็นการปกป้องการแห้งจากความเย็น (cryoprotectant) ใช้เติมในสารเสริมการแขวนลอย (suspending agent) เช่น ในซุป น้ำผลไม้ข้น ใช้เป็นสารเสริมความคงตัว (stabilizer) ในคุกกี้ เนยเทียม นอกจากนี้ยังใช้เติมในสารเพื่อช่วยยึดจับน้ำ (binder) เช่นในซุปข้น ขนมปัง เค้ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4 การใช้ประโยชน์จากเซลลูโลสด้วยการย่อยสลายน้ำตาล
ที่มา : ปราณี (2543)

2. เอนไซม์เซลลูเลส

เอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสและอนุพันธ์ของเซลลูโลสคือ เซลลูเลส ซึ่งโดยทั่วไปเป็นเอนไซม์ผสม ประกอบด้วยเอ็นไซม์หลายชนิดทำงานร่วมกัน มี systematic name ว่า β-1,4 glucan-4-glucanohydrolase (EC. 3.2.1.4) (พรทิพย์, 2528)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1 ระบบเอนไซม์เซลลูเลส (ปราณี 2543, พรเทพ, 2538 และ พรทิพย์, 2528)

จากการศึกษาโดยการแยก และทำให้บริสุทธิ์ เพื่อศึกษาระบบของเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าเซลลูเลสเป็น multicomponent enzyme มีระบบเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิดทำงานร่วมกัน คือ (พรเทพ, 2538)

ก. เอนไซม์ C_1 หรือเรียกว่า hydrogen bondase (ปราณี, 2543)

ทำหน้าที่กระตุ้นหรือแตกสายเซลลูโลสให้มีสภาพที่เหมาะสม คือ ทำให้พันธะไฮโดรเจนอ่อนลง (weakening) สำหรับเป็นสับสเตรทของเซลลูโลสลำดับต่อไป คือ เอนไซม์ C_X, กลูคาเนส ทั้งนี้พบว่าไม่มีหลักฐานการย่อยสลายพันธะไกลซิล

ข. เอนไซม์ C_X หรือ β-1,4 glucanases (ปราณี, 2543)

เป็นเซลลูเลสที่ย่อยสลายพันธะในเซลลูโลส หรืออนุพันธ์ของเซลลูโลสที่ละลายน้ำได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายสับสเตรทที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้ กล่าวคือ สามารถย่อยสลายพันธะ β-1,4 ของสับสเตรทสังเคราะห์ เช่น carboxymethyl-cellulose (CMC) หรือ hydroxyethyl-cellulose แบ่งเอนไซม์ในกลุ่มนี้เป็น 2 ชนิด คือ

2.1 <u>เอนโด-เบตา-1,4-กลูคาเนส</u> (Endo-β-1,4 glucanases) (พรเทพ, 2538)

เอนไซม์นี้จะตัดพันธะระหว่างโมเลกุลของกลูโคส ภายในสายเซลลูโลสแบบสุ่ม (random) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ผสมหลายชนิด คือ กลูโคส และเซลโลไบโอส โดยจะได้เซลโลไบโอสเป็นผลิตภัณฑ์หลัก

2.2 <u>เอกซ์โซ-เบตา-1,4-กลูคาเนส</u> (Exo-β-1,4 glucanases) (พรเทพ, 2538)

ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสโดยตัดพันธะของ β-1,4 glucosidic จากปลายด้านของ non-reducing end ไปอย่างมีระเบียบ ทำให้ได้เซลโลไบโอส และกลูโคส (ในปริมาณที่น้อย) น้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายจะมีการเปลี่ยนโครงรูปของผลผลิต คือ เปลี่ยน β- เป็น α-configuration (inversion)

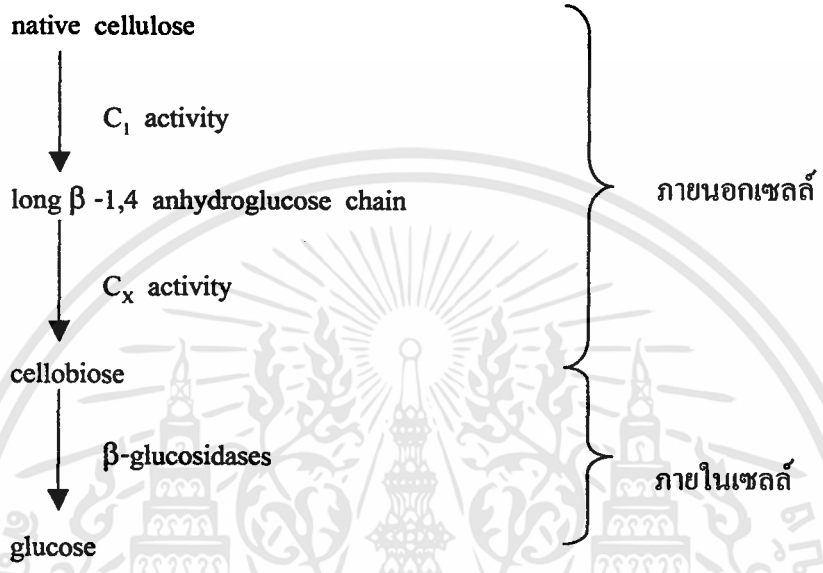
ค. เบตา-กลูโคซิเดส (β-glucosidases) หรือ cellobiase (EC. 3.2.1.21) (ปราณี, 2543)

คล้าย exoglucanase คือมี common substrate เป็นเซลโลไบโอสถึงเซลโลเฮกโซส (กลูโคส จาก 2-6 units) แต่อัตราการย่อยสลายแตกต่างกัน คือ อัตราเร็วจะลดลงเมื่อความยาวสายพอลิเมอร์เพิ่มขึ้น และผลผลิตที่ได้คือ กลูโคส ซึ่งมีโครงรูปเปลี่ยนจากเดิม

β-glucosidases และ Exo-β-1,4 glucanases สามารถย่อยสับสเตรทได้ 2 ชนิดคือ เซลโลไบโอส และเซลโลเฮกโซส (6 glucose unit) β-glucosidases จะย่อยสลายเซลโลไบโอสได้มากและเร็วกว่าเซลโลเฮกโซส แต่ Exoglucanase จะย่อยสลายเซลโลเฮกโซสได้มากและเร็วกว่าเซลโลไบโอส (พรทิพย์, 2528) ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า C_1 จะย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็น linear

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

chain และ C_X จะย่อยสลาย linear chain ได้ cellobiose ทั้งหมดนี้จะเป็นปฏิกิริยาภายนอกเซลล์ จากนั้น cellobiose จะผ่านผนังเซลล์เข้าไปภายในเซลล์ แล้วเอนไซม์ ภายในเซลล์จะย่อยสลายเซลโลไบโอสให้เป็นกลูโคส ดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 ขั้นตอนการย่อยสลายเซลลูโลส
ที่มา : (พรทิพย์, 2528)

2.2 สมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส

จากการศึกษาถึงโครงสร้างของเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าเซลลูเลสเป็น glycoprotein ประกอบด้วยโปรตีน และคาร์โบไฮเดรตในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000 ถึง 60,000 ดาลตัน มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี ไม่ต้องการ co-factor หรือโลหะอื่นๆในการทำปฏิกริยา โดยทั่วไปเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากจุลินทรีย์ มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานประมาณ 50 องศาเซลเซียส ยกเว้นจุลินทรีย์ที่ทนร้อนบางชนิด (พรเทพ, 2538) สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส (ปราณี, 2543) นอกจากนี้เอนไซม์ เซลลูเลสยังมีความคงทนต่ออุณหภูมิสูง ทนต่อความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ในช่วงกว้างประมาณ 4.0 ถึง 8.0 และคงทนต่อสารเคมีได้ดี สามารถเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 และ 4.0 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลาหลายปี หรือ เก็บโดยวิธี freeze dry หรือตกตะกอนด้วยอะซิโตน หรือ เอทธานอล โดยไม่สูญเสียคุณสมบัติ (พรเทพ, 2538) และจะถูกยับยั้งด้วย อิออนของโลหะหนัก สารพวกซัลไฟดริล สาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน และโดยผลผลิตคือ กลูโคส สามารถวัดแอคติวิตีจากการวัดหมู่รีดิวซ์ที่เกิด นิยมใช้สับสเตรทที่ละลายน้ำได้ดี คือ สับสเตรทสังเคราะห์ เช่น คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส (ปราณี, 2543) อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน ย่อมมีคุณสมบัติแตกต่างกัน (พรเทพ , 2538)

2.3 ประโยชน์ของเอนไซม์เซลลูเลส

การใช้เอนไซม์ในอุตสาหกรรมได้มีวิวัฒนาการเรื่อยมาจนถึงปัจจุบัน ทั้งนี้ในลักษณะการใช้งานจะเป็นไปตามลักษณะของเอนไซม์นั้นๆ โดยมีวัตถุประสงค์ต่างๆกัน เพื่อการผลิตสารใหม่ เพื่อปรับปรุงคุณภาพผลิตภัณฑ์ อาทิเช่น (ปราณี, 2543)

1. อุตสาหกรรมผงซักฟอก เพื่อขยายเส้นใยเซลลูโลสของผ้า ทำให้เอนไซม์เข้าสู่เนื้อผ้า และทำให้สิ่งสกปรกหลุดจากเนื้อผ้าได้ดีขึ้น (ปราณี, 2543)

2. อุตสาหกรรมกาแฟ ช่วยย่อยสลายเซลลูโลสในระหว่างการทำเมล็ดกาแฟให้แห้ง (ปราณี, 2543)

3. อุตสาหกรรมผลไม้ ช่วยแยกส่วนเนื้อหยาบของผลแพร์, แยกเปลือกของผลอะปริคอต ผลมะเขือเทศ (ปราณี, 2543) ทำให้เนื้อเยื่อของผลไม้นุ่มขึ้น และช่วยเพิ่มผลผลิตในการทำน้ำผลไม้ (Beguin and Aubert , 1992)

4. อุตสาหกรรมเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เพื่อย่อยสลายเซลลูโลสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็กสำหรับหมักแอลกอฮอล์ (ปราณี, 2543)

นอกจากนี้ยังมีการใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเชื้อเพลิง และสารเคมี (Beguin and Aubert , 1992)

3. จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส

เซลลูโลสเป็นสารอินทรีย์ที่ถูกทำลายได้ยาก จุลินทรีย์จึงนับว่ามีความสำคัญในการย่อยสลายเซลลูโลสมาก จุลินทรีย์หลายชนิดที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อยสลายเซลลูโลส มักอยู่ในกลุ่มของเชื้อรา แบคทีเรีย แอคติโนมัยสีท ดังแสดงในตารางที่ 1 (พรเทพ, 2538) นอกจากนี้ยังพบเอนไซม์เซลลูเลสในสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังอีกหลายชนิด เช่น หอยทาก (*Helix pomatia*) หอยทะเลหลายชนิด crayfish และ sea urchin แบคทีเรียบางชนิดมีความสามารถเฉพาะตัวในการย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อใช้เป็นพลังงาน (นวลพรรณ, 2524) นอกจากนี้จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส ยังสามารถพบได้ในธรรมชาติตามแหล่งต่างๆที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ ซึ่งพบว่าในกระเพาะรูเมนมีจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้

เชื้อรา	เชื้อแบคทีเรีย	เชื้อแอคติโนมัยสีท
Alternaria sp.	*Bacillus sp.*	*Micromonospora sp.*
Aspergillus sp.	*Cellulomonas sp.*	*Nocardia sp.*
Chaetomium sp.	*Clostridium sp.*	*Strephomyces sp.*
Corprinus sp.	*Corynebacterium sp.*	*Streotasporangium sp.*
Foames sp.	*Cytophaga sp.*	
Fusarium sp.	*Polyangium sp.*	
Myrothecium sp.	*Pseudomonas sp.*	
Penicillium sp.	*Sporocytophaga sp.*	
Polyporus sp.	*Vibrio sp.*	
Rhizoctonia sp.		
Thielavia sp.		
Trametes sp.		
Trichothecium sp.		
Trichoderma sp.		
Verticillium sp.		
Zygorhynchus sp.		

ที่มา : พรเทพ (2538)

แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสในกระเพาะของสัตว์เคี้ยวเอื้อง สามารถแบ่งตามลักษณะรูปร่างและการสร้างสปอร์ ออกเป็น 3 ชนิด (ตารางที่ 2) คือ

1. แบคทีเรียที่สร้างสปอร์ มีลักษณะเป็นแท่ง (spore-forming rods)
2. แบคทีเรียที่ไม่สร้างสปอร์ มีลักษณะเป็นแท่ง (non-spore-forming rods)
3. แบคทีเรียที่มีลักษณะกลม

โดยทั่วไปแล้วการที่แบคทีเรียในกระเพาะรูเมนจะเข้าย่อยสลาย หรือใช้ประโยชน์จากอาหารเยื่อใยได้อย่างเต็มที่และมีประสิทธิภาพนั้น จำเป็นจะต้องอาศัยปัจจัยต่างๆ ดังต่อไปนี้คือ

1. จำเป็นจะต้องมีประชากรของแบคทีเรียอยู่อย่างเพียงพอและคงที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสในกระเพาะของสัตว์เคี้ยวเอื้อง

Microorganism		
Sporeforming rod	Non-Sporeforming rod	Cocci
Clostridium cellobioparum	*Butyrivibrio fibrisolvens*	*Ruminobacter parvum*
Micromonospora propinici	*Eubacterium cellulosolvens*	*Ruminococcus flavefaciens*
	Bacteroides ruminicola	*Ruminococcus albus*
	Succinimonas amylolytica	
	Bacteroides succinogenes	
	Butyrivibrio alactacidigens	

ที่มา : พิพัฒน์ (2527)

2. จำเป็นที่แบคทีเรียจะต้องเกาะยึดติดกับผิวของอาหารเยื่อใยเป็นเวลาที่เหมาะสม

3. ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของอาหาร

4. จำเป็นต้องมีอัตราการย่อยสลาย (rate of degradation) ผลการย่อยสลายสุดท้าย (extent of degradation) และอัตราการย่อยสลายจากอนุภาคใหญ่เป็นอนุภาคเล็กในอัตราความเร็วสูง รวมทั้งขนาดความจุของกระเพาะรูเมนด้วย (เมธา, 2529)

4. จุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน

เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าในระบบการย่อยอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง ตัวที่มีบทบาทสำคัญคือจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน ทั้งนี้เพราะ 70-85 เปอร์เซ็นต์ ของวัตถุแห้งที่ย่อยได้ในอาหารจะถูกย่อยในส่วนนี้ ให้ได้เป็นกรดไขมันระเหยได้ (volatile fatty acid - VFA) คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) มีเทน (CH_4) แอมโมเนีย (NH_3) และตัวจุลินทรีย์เองก็จะมีการเพิ่มประชากรขึ้น คาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องทั้งในรูปของรูปเยื่อใย และคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้ง่าย ก็จะถูกย่อยด้วยจุลินทรีย์ในรูเมนเช่นกัน นอกจากกรดและก๊าซดังกล่าวแล้ว จุลินทรีย์บางชนิดยังสามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนที่จำเป็น (essential amino acids) และวิตามินบีได้ (บุญล้อม, 2527)

จุลินทรีย์ในรูเมนมีมากมายหลายชนิด บางชนิดก็มีอยู่ประจำในรูเมน (habitant) บางชนิดก็ติดเข้าไปกับอาหารที่กิน นอกจากนี้ประชากรของมันยังอาจเปลี่ยนแปลงไปได้ทั้งนี้แล้วแต่อาหารที่สัตว์ได้รับ (บุญล้อม, 2527)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สภาพภายในรูเมนเหมาะแก่การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์มาก คือมี pH อยู่ในช่วง 5.5-7.0 และอุณหภูมิ 39-40 องศาเซลเซียส ซึ่งเหมาะสมสำหรับเอนไซม์หลายชนิด การที่มันได้รับอาหารเกือบตลอดเวลา และการที่กระเพาะรูเมนบีบตัวก็ช่วยให้จุลินทรีย์ได้สัมผัสกับอาหารใหม่ๆ เสมอ นอกจากนี้กระเพาะรูเมนยังมีความชื้นสูง อีกทั้งกรดและก๊าซต่างๆที่เกิดขึ้นก็จะถูกดูดซึมออกจากกระเพาะตลอดเวลา ทำให้มีจุลินทรีย์เจริญอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งอาจจะถึง 10 เปอร์เซ็นต์ ของของเหลวในรูเมน (บุญล้อม, 2527)

อย่างไรก็ดีประชากรของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนไม่ได้อยู่คงที่ มันจะแปรผันไปตามชนิดของอาหารที่กิน ทั้งนี้เนื่องจากจุลินทรีย์บางชนิดก็สามารถใช้อาหารได้เฉพาะอย่าง ถ้ามีอาหารชนิดนั้นมากมันก็จะเจริญได้ดี แต่ถ้ามีอาหารชนิดนั้นน้อยมันก็จะลดจำนวนลง แต่จุลินทรีย์บางชนิดก็สามารถใช้อาหารได้หลายชนิด ฉะนั้นมันจะสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพต่างๆได้ ดังนั้นประชากรของจุลินทรีย์จึงมักจะมีการเปลี่ยนแปลงอยู่เสมอ (บุญล้อม, 2527)

จุลินทรีย์ที่อยู่ในรูเมนมี 2 จำพวกใหญ่ๆ คือ แบคทีเรีย และ ciliated protozoa พวกอื่นก็อาจจะมีบ้างแต่ก็เป็นจำนวนน้อยกว่า สภาพในรูเมนเป็นสภาพไร้ออกซิเจน ดังนั้นจุลินทรีย์จะมีชีวิตอยู่ได้ก็ต้องเป็นพวกที่ไม่ใช้อากาศ (anaerobe) หรือพวกที่ใช้อากาศหรือไม่ใช่อากาศก็ได้ (facultative anaerobe) จุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศ (aerobe) ก็อาจจะพบได้ในรูเมนเหมือนกัน ซึ่งพวกนี้มักจะติดกับน้ำหรืออาหารที่กินเข้าไป จุลินทรีย์พวกนี้จะมีชีวิตอยู่ได้เพียงระยะหนึ่งเท่านั้น ในที่สุดก็ต้องตายเพราะขาดออกซิเจน แต่เมื่อสัตว์กินอาหารและน้ำเข้าไปเสมอๆ จุลินทรีย์ที่ติดเข้าไปก็มีอยู่ตลอดเวลา ทำให้อาจเข้าใจผิดได้ว่าเป็นแบคทีเรียที่มีประจำอยู่ในกระเพาะรูเมนก็ได้ อย่างไรก็ตามเพื่อให้สะดวกในการพิจารณาจึงมีข้อสังเกตุว่า จุลินทรีย์ที่มีประจำในกระเพาะรูเมนควรจะมีคุณสมบัติดังนี้ (บุญล้อม, 2527)

ก. จะต้องมีชีวิตอยู่ได้ในสภาพไร้ออกซิเจน

ข. จะต้องสร้างผลิตภัณฑ์ชนิดใดชนิดหนึ่งที่พบในรูเมนได้

ค. จะต้องมีปริมาณไม่ต่ำกว่า 1 ล้านตัว/กรัมของ rumen

จุลินทรีย์บางชนิดอาจพบในสัตว์เคี้ยวเอื้องพวกหนึ่ง แต่ไม่พบในอีกพวกหนึ่งก็ได้ ทั้งนี้เนื่องมาจากลักษณะนิสัยในการกิน และสภาพแวดล้อมในกระเพาะ นอกจากนี้จุลินทรีย์ที่มีมากในลำไส้ของสัตว์ต่างๆ เช่น *Escherichia coli* และ *Salmonellae* ก็กลับมีน้อยในรูเมน ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากมันไม่ชอบกรดไขมันที่ระเหยได้ (บุญล้อม, 2527)

จะเห็นได้ว่าในรูเมนมีสภาพต่าง ๆ ระบบในร่างกายของสัตว์เคี้ยวเอื้องจะมีการจัดหรือควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ให้เหมาะสม เพื่อให้จุลินทรีย์สามารถเจริยเติบโตและสร้างผลิตภัณฑ์สุดท้ายออกมามากที่สุด ซึ่งสามารถแบ่งชนิดของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนออกเป็นหลักๆได้ดังนี้ คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1 <u>แบคทีเรีย</u> (บุญล้อม, 2527)

แบคทีเรียในรูเมนส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นแท่งสั้นๆ (cocci หรือ short rods) มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.4-1.0 μ ยาว 1-3 μ แต่ลักษณะอื่นเช่น Spirochetes, rosettes, ovals และ tetracocci ก็มีบ้าง การจัดจำพวกแบคทีเรียในรูเมนอาจทำได้โดยใช้วิธีต่างๆกัน เช่นจำแนกตามลักษณะภายนอก (คือดูรูปร่างและขนาดของเซลล์) ดูปฏิกิริยาการย้อมสี ฯลฯ หรืออาจจะจำแนกตามสารตั้งต้นที่ใช้ ตามผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่สร้างขึ้น ตามองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ หรือใช้หลายๆอย่างประกอบกันก็ได้ ถึงแม้ว่าแบคทีเรียจะเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กแต่ก็ค่อนข้างซับซ้อน ฉะนั้นไม่ว่าจะใช้วิธีไหนก็ไม่สามารถจัดจำพวกได้สมบูรณ์ทั้งนั้น อย่างไรก็ดีการจัดจำพวกโดยอาศัยชนิดของอาหารที่แบคทีเรียนำไปใช้เป็นแหล่งของพลังงานก็เป็นวิธีที่นิยมกันมากวิธีหนึ่ง ถึงแม้ว่าจะมีความขัดแย้งกันบ้าง เนื่องจากในการศึกษาทดลองแต่ละแห่งใช้อาหารเลี้ยงเชื้อต่างกัน

Hungate (1966) และนักวิทยาศาสตร์บางท่านได้จัดจำพวกของแบคทีเรียตามอาหารที่ใช้และผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่สร้างขึ้น ได้ดังนี้

1. <u>Cellulolytic bacteria</u> พวกนี้สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ เนื่องจากมีเอนไซม์เซลลูเลส นอกจากนี้ยังสามารถใช้เซลโลไบโอส (ซึ่งเป็น disaccharide ที่ประกอบด้วยกลูโคสเชื่อมกันด้วย β-linkage) ได้ จากการศึกษาโดยใช้ pure culture พบว่าการย่อยสลายเซลลูโลสเกิดขึ้นช้ามาก แสดงว่าในธรรมชาติการย่อยสลายเซลลูโลส เกิดเนื่องจากแบคทีเรียหลายชนิดทำหน้าที่ร่วมกัน แบคทีเรียพวกนี้มักพบมากในรูเมนของสัตว์ที่กินอาหารหยาบ แต่ในทางเดินอาหารของสัตว์กระเพาะเดี่ยวก็มีบ้างเหมือนกัน พวก cellulolytic bacteria ที่สำคัญที่พบในรูเมนได้แก่ *Ruminococcus albus, R. flavefaciens* และ *Bacteroides succinogenes* พวกแรกมักเจริญเป็นตัวเดี่ยวๆหรือเป็นคู่ ไม่มีสี ผลิตไฮโดรเจน ethanol formate acetate และ lactate พวกที่ 2 อาจมีสีเหลืองหรือไม่มีก็ได้ เจริญเป็นสาย ผลิตไฮโดรเจน formate acetate lactate และ succinate แต่ไม่ผลิต ethanol ส่วนพวกที่ 3 เป็น gram-negative rod สร้าง succinic acid เป็นส่วนใหญ่ มี acetic และ formic acid บ้าง

สำหรับ cellulolytic bacteria ชนิดอื่น เช่น *Clostridium locheadi* และ C. *longisporum* แม้ว่าจะย่อยสลายเซลลูโลสได้ แต่ก็ไม่ค่อยพบในรูเมน

2. <u>Hemicellulose digesting bacteria</u> เฮมิเซลลูโลสต่างจากเซลลูโลสตรงที่ นอกจากจะมีน้ำตาล hexose แล้วยังมี pentose และ uronic acid ประกอบด้วย เฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของพืช แบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้ จะสามารถย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสได้ด้วย แต่พวกที่ย่อยเฮมิเซลลูโลสได้อาจจะย่อยเซลลูโลสไม่ได้ก็ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

96876

แบคทีเรียที่เป็น hemicellulose fermenter ที่สำคัญที่สุดคือ *Butyrivibrio fibrisolvens* แต่ตัวอื่นๆ เช่น *Bacteroides ruminicola, B. succinogenes* และ *Lachnospira multiparus* ก็สามารถย่อยเฮมิเซลลูโลส และเพคตินได้ดี

3. Amylolytic bacteria แบคทีเรียพวกนี้ทำหน้าที่ย่อยแป้ง พวก cellulolytic bacteria หลายชนิดอาจจะทำหน้าที่ย่อยแป้งได้ แต่พวกที่ย่อยแป้งบางชนิดก็ไม่สามารถย่อย cellulose ได้ ความจริงในสัตว์ที่กินหญ้าตามธรรมชาติ การย่อยแป้งไม่ใช่สิ่งที่จำเป็นสำหรับแบคทีเรียในรูเมน ทั้งนี้เพราะ polysaccharide ที่อยู่ในพืช อยู่ในรูปของแป้งเป็นส่วนน้อย แต่ในสัตว์ขุนในคอกอาหารส่วนใหญ่จะประกอบด้วยเมล็ดธัญพืช ฉะนั้นการย่อยแป้งจึงกลายเป็นหน้าที่สำคัญของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน

แบคทีเรียที่พบเสมอในกระเพาะรูเมนที่สามารถย่อยแป้งได้ คือ *Streptococcus bovis* แต่มักพบในปริมาณต่ำ มันจะขับ α-amylase ออกมาเป็นจำนวนมาก ย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตของ non-amylolytic bacteria แต่ถ้า *S. bovis* เจริญมากไปก็อาจรบกวนการย่อยได้

นอกจากนี้บาง strain ของ *Bacteroides succinogenes, B. ruminicola* และ *B. amylophilus* รวมทั้ง strain ของ *Butyrivibrio fibrisolvens* ก็สามารถย่อยแป้งได้เหมือนกัน โดยจะให้ product เป็น formic, acetic และ succinic acid และยังสามารถย่อยคาร์โบไฮเดรตอื่นที่นอกเหนือจากแป้งได้ด้วย

4. แบคทีเรียที่ใช้น้ำตาลเป็นอาหาร โดยปกติแบคทีเรียที่กล่าวมาแล้วใน 3 กลุ่มแรกมักจะสามารถย่อยน้ำตาลได้ด้วย แต่แบคทีเรียในกลุ่มที่ 1 นี้จะไม่สามารถย่อย polysaccharides ได้ มันต้องอาศัยน้ำตาลที่มีอยู่เล็กน้อยในพืช หรือผลิตภัณฑ์ที่แบคทีเรียอื่นย่อยไว้ หรือจากเซลล์ของแบคทีเรียที่แตกหรือตาย แบคทีเรียพวกนี้ได้แก่ *Eubacterium ruminantium* และ *Lactobacilli sp.* อย่างไรก็ดีพวกหลังนี้มักจะไม่พบมากในรูเมนของสัตว์โต ยกเว้นในกรณีที่สัตว์กินแป้งมาก โดยมันจะอาศัย maltose ที่ได้จากการย่อยแป้งของ *S. bovis* อีกทีหนึ่ง

5. Proteolytic และ Deaminative bacteria แบคทีเรียที่สามารถย่อยโปรตีนได้ดีที่สุดคือ *Bacteroides amylophilus* แต่พวก *Bacteroides* อื่นๆ รวมทั้งพวก *Selenomones, Butyrivibrio, Succinivibrio* และ *Borrelia* ก็มี proteolytic activity เหมือนกัน

สำหรับ deaminative นั้น แบคทีเรียที่ active ที่สุดคือ *Bacteroides ruminicola* แบคทีเรียเหล่านี้ต้องการคาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งพลังงาน และไม่สามารถเจริญบนกรดอะมิโนหรือโปรตีนอย่างเดียวได้ พวกนี้จะสร้างแอมโมเนีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. Ureolytic bacteria ถึงแม้ว่ายูเรียจะเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของน้ำลายสัตว์เคี้ยวเอื้องและถูก hydrolysed อย่างรวดเร็วในกระเพาะรูเมนให้เป็น NH_3 และ CO_2 เช่นเดียวกับยูเรียในอาหาร แต่ก็ยังไม่ทราบแน่ชัดว่า ureolytic activity นี้มาจากไหน ทั้งนี้เพราะไม่ทราบว่าแบคทีเรียชนิดไหนจะสามารถผลิต urease ได้มาก อาจจะเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียพวกที่มี urease activity มักไม่ใช่ชนิดที่สำคัญใน rumen metabolism หรืออาจจะเป็นไปได้ว่า urease นี้มาจากแบคทีเรียหลายชนิดรวมกัน อย่างไรก็ดี พบว่า *Streptococcus* มี urease activity สูงที่สุด

7. Lipolytic และ hydrogenating bacteria ไขมันที่ประกอบด้วยกรดไขมันสายยาวๆ ที่พบในอาหารสัตว์จะถูก hydrolysed อย่างรวดเร็ว โดย mixed rumen bacteria แต่ตัวที่เป็น lipolytic bacterium ที่แท้จริงมีเพียงตัวเดียวคือ *Anaero vibrio lipolytica*

เป็นที่ทราบกันแล้วว่ากรดไขมันสายยาวๆ ไม่อิ่มตัวในอาหารจะถูก hydrogenate ให้เป็นกรดไขมันอิ่มตัวในกระเพาะรูเมน แต่ก็เป็นการยากที่จะศึกษาหรือแยกแยะได้ว่าแบคทีเรียตัวไหนที่ทำหน้าที่ hydrogenation บาง strain ของ *Butyrivibrio fibrisolvens, Ruminococcus albus* และพวก Eubacterium สามารถที่จะ hydrogenate linoleic หรือ linollenic ได้ แต่ก็ไม่ได้ hydrogenate ให้สมบูรณ์จนเป็น stearic acid ดังที่เกิดในรูเมน จากการศึกษาเมื่อเร็วๆนี้พบว่า two strain ของ Fusiform bacteria ที่อยู่ใน Genus Fusocillus สามารถ hydrogenate linoleic หรือ oleic acid ให้เป็น strearic acid ได้

8. Methanogenic bacteria คือแบคทีเรียที่สร้าง methane ในกระเพาะรูเมน มีเทนจะถูกสร้างขึ้นจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง H_2 กับ CO_2 หรือ formate แบคทีเรียที่ทำหน้าที่คือ *Methanobacterium ruminantium* และ *M. mobilis*

นอกจากแบคทีเรียประเภทต่างๆที่กล่าวมาแล้ว ยังมีแบคทีเรียบางชนิดที่ทำหน้าที่เปลี่ยน intermediate product ที่เกิดขึ้นในรูเมนให้เป็นสารอื่นต่อไป หรือสร้างวิตามินบี เป็นต้น (บุญล้อม, 2527)

ในตารางที่ 2 แสดงถึงลักษณะและรายละเอียดอื่นๆ เกี่ยวกับแบคทีเรียชนิดต่างๆที่สามารถเลี้ยงได้ในระบบ in vitro

4.2 โปรโตซัว

โปรโตซัวมีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรีย ซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดธรรมดา ทำให้สามารถศึกษาถึงรายละเอียดของมันได้มากขึ้น (เมธา, 2529)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 ลักษณะและรายละเอียดอื่น ๆ ของแบคทีเรียชนิดต่างใน rumen

Bacteria	Shape of cell	Gram stain	Size, μ	Motility	Important function	Some energy sources used						
						Glucose	Cellulose	Xylan	St arch	Lactate	Glycerol	
Bacteroides succinogenes	rod to coccoid	-	0.3-0.4 by 1-2	-	Attacks resistant cellulose	+	+	-		-	-	
Ruminococcus flavefaciens	cocci, usually in chains		0.8-1.0	-	Fiber digrstion				-	-	-	
Ruminococcus albus	cocci		0.8-2.0	-	Fiber digrstion				-	-	-	
Bacteroides amylophilus	rod to coccoid	-	0.0-1.6 by 1.6-4.0	-	Starch digrstion	+	-			-	-	
Succinimonas amylolytica	coccoid to rod	-	1.0-1.5 by 2.2-3.0	+	Starch digrstion	+	-	-	+	-	-	
Veillonella alcalescens	cocci	-	0.3-0.6	-	Lactate fermenter	-	-	-	-	+	-	
Methanobacterium ruminantum	curved rod	+	0.7-0.8 to 1.8	-	Methane production	-	-	-	-	-	-	(H_2+CO_2)
Vibrio lipolytica	rods		0.4 by 1.2-3.6	+	Lipolytic	-	-	-	-	-	+	(Fructose)
Peptostreptococcus elsdenii	cocci to chains	-	1.2-2.4	-	Lactate fermenter	+	-	-	-	+		(Sucrose)
Clostidium lochheadii	rods		0.7-1.7 by 2.0-6.0	-	Cellulose digester Poor forage	+	+	-	+			(Fructose)

ตารางที่ 2 ต่อ

Bacteria	Shape of cell	Gram stain	Size, μ	Motility	Important function	Some energy sources used						
						Glucose	Cellulose	Xylan	St arch	Lactate	Glycerol	
Clostridium longisporum	rods		1.0 by 7-12 or 2.3	+	?	+	+	-	-			
	spirochete	-	by 7.0	+	?	+	-	-	-	+		(Sugars)
Lachnospeia multiparus	curved rod		0.3-0.5 by 4.0-7.0	+	Pectin digester	+	-	-		-	-	(Pectins)
Cillobacterium cellulosolvens	coccoid to rod		0.4-0.6 by2.0-4.0	+	Cellulose digester	+	+	-	-	-	-	
Butyrivibrio fibrisolvens	curved rod	-	0.5-0.7 by 1.0-2.0	+	Starch digrstion to	+				-	-	(Saccharides)
			0.4-0.6 by 2.0-5.0		windely adapted							
Butyrivibrio alactacidigens	curved rod			+	Starch digrstion to	+	-	+	+			(Disaccharides)
			0.5-1.0 by 1.5-8.0		windely adapted							
Bacteroides ruminicola	coccoid to rod	-		-	windely adapted	+	-	+	+	-	-	
	to irregular		0.8-1.0									
Selenomonas ruminantium	crescentic	-	0.8-30.0	+	windely adapted	+	-	-				
Selenomonas lactilytica	crescentic		0.8-2.5 by 2.0-7.0	+	Lactate fermenter to	+	-	-		+	+	
			0.4-0.6 by 1.8-3.0		windely adapted							

17499

ตารางที่ 2 ต่อ

Bacteria	Shape of cell	Gram stain	Size, μ	Motility	Important function	Some energy sources used						
						Glucose	Cellulose	Xylan	St arch	Lactate	Glycerol	
Butyrivibrio dextrinosolvens	spiral	-	0.3-0.5 by1.0-1.5	+	Dextran fermenter	+	-	-	-	-	-	(sugar)
Streptococcus bovis	coccoi	+	0.7-0.9	-	Starch digestion to various	+	-	-	+	-	-	
Eubacterium ruminatium	coccoi to rod	+	0.4-0.7 by 0.7-1.5	-	Sugar, xykan	+	-	+	-	-	-	
Eubacterium bakeri	cocci		1.0-4.0	-	?							
Lactobacilli sp.	rod	+	0.7-1.0 by 1-6	-	windely adapted under acidic conditions	+	-	-		-	-	

ที่มา : เมธา วรรณพัฒน์, 2525

โปรโตซัวทุกชนิดในกระเพาะรูเมนไม่ต้องการออกซิเจน ดังนั้นมันจึงไม่สามารถที่จะมีชีวิตอยู่ได้นานถ้าสัมผัสกับอากาศ อุณหภูมิที่พอเหมาะสำหรับการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกับอุณหภูมิของร่างกายคือประมาณ 39 องศาเซลเซียส ถ้าถูกปรับอากาศเย็นมันจะตาย โปรโตซัวส่วนใหญ่จะเป็นพวก ciliated (บุญล้อม, 2527)

การจัดจำพวกโปรโตซัวมักนิยมถือตามลักษณะภายในเซลล์ (cell morphology) ทั้งนี้เพราะมันมีขนาดตัวใหญ่ คืออาจจะกว้างตั้งแต่ 15-109 μ และยาวตั้งแต่ 38-195 μ จึงสามารถที่จะมองเห็นลักษณะภายในได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา อย่างไรก็ดีอาจมีการจัดจำพวกโดยอาศัยคุณสมบัติอื่นบ้าง และจำนวน genera หรือ sp ที่ได้ก็อาจจะแตกต่างกันไป ซึ่งสามารถแบ่ง ciliated protozoa ได้เป็น 2 subclass คือ *Holotrichia* และ *Spirotrichia* (บุญล้อม, 2527)

4.3 รา

กลุ่ม anaerobic fungi เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่พึ่งจะพบเมื่อเร็วๆนี้ โดยทำหน้าที่เกี่ยวกับการหมักย่อยอาหารในรูเมน โดยพบว่าเชื้อราเหล่านี้ฝังตัวอยู่ในเยื่อใยของอนุภาคอาหาร และเชื่อว่ามีส่วนในการช่วยย่อยสลายพวกเซลลูโลส สำหรับประชาการ การเข้าย่อยสลายอนุภาคอาหารและความต้องการไนโตรเจนของเชื้อราเหล่านี้ ยังเป็นเรื่องที่จะต้องศึกษาต่อไป (เมธา, 2529)

5. การแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสจากธรรมชาติ

การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ดี เริ่มต้นในศตรรษที่ 19 โดยนักโรคพืชในสมัยนั้น ได้ทำการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากต้นพืชที่เป็นโรค พบเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศ (anaerobic bacteria) และเชื้อรา เป็นตัวสำคัญที่ทำให้ต้นพืชเกิดโรค การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสโดยเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ จะเกิดตรงบริเวณที่จุลินทรีย์เข้าทำอันตราย (สุนทร, 2516) หลังจากนั้นการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ก็ได้รับความสนใจมากขึ้น รวมไปถึงการศึกษาสูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ การนำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม เป็นต้น (พรเทพ, 2538) ซึ่งในปัจจุบันการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสก็ยังคงทำการศึกษากันอยู่เรื่อยมา ดังเช่น (พรเทพ, 2538)

พิพัฒน์ (2527) ได้ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสจากกระเพาะวัว ได้เชื้อแบคทีเรียทั้งสิ้น 113 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้คือ สายพันธุ์ CU1, CU3 และ CU4 พบว่าทั้งสามสายพันธุ์เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อน โดยเพาะเลี้ยงลงในอาหาร Rumen Fluid Cellulose Agar (RFCA) และเมื่อย่อยสลายเซลลูโลสแล้วจะได้ อะซิเตท ซัคซิเนท ก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุวรรณา (2528) ได้ทำการศึกษาบทบาทของจุลินทรีย์จำพวกแบคทีเรียที่มีผลต่อการย่อยสลายเศษพืช เพื่อใช้เป็นปุ๋ยหมัก โดยศึกษากิจกรรมของแบคทีเรียร่วมกับการใช้ปุ๋ยเคมี (16-20-0) และไม่ใช้ปุ๋ยเคมี ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มแรกได้จากการแยกเชื้อจุลินทรีย์ในกองปุ๋ยหมักกากอ้อยมีอยู่ 8 สายพันธุ์ และอีกกลุ่มได้รับจากกรมพัฒนาที่ดินจำนวน 9 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายหญ้าคาได้ดีที่สุด คือ สายพันธุ์ BD 76 ซึ่งได้จากกรมพัฒนาที่ดิน และพบว่าตำรับที่ได้รับปุ๋ยเคมี การสลายตัวของเศษพืชสลายตัวได้รวดเร็วกว่าในตำรับที่ไม่ใส่ปุ๋ยเคมี

พรเทพ (2538) ได้ทำการแยกเชื้อรา ที่แยกจากดินบริเวณใต้ต้นป่าศรนารายณ์ และวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมทำเชือก จากอำเภอหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 41 ตัวอย่าง ดินปริเวนใต้ต้นป่าศรนารายณ์ เศษต้นและใบป่าศรนารายณ์ จากอำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี จำนวน 22 ตัวอย่าง และดินบริเวณใต้ต้นป่าศรนารายณ์ เศษต้นและใบป่าศรนารายณ์ จากอำเภอโนนสูง จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 31 ตัวอย่าง ได้เชื้อราทั้งสิ้น 99 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดี คือ เชื้อ *Acrophialophora sp.* ซึ่งเป็นเชื้อราที่อยู่ใน class fungi Imperfecti order Moniliales family Moniliaceaen genus Acrophialophora เชื้อราสายพันธุ์นี้สามารถพบได้ทั้งในดิน อากาศ และพืชหลายชนิด เช่น หญ้า ฝ้าย ข้าวโพด เป็นต้น Hungate (1947) ไดทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสจากกระเพาะวัว พบว่าเชื้อ Bacteroides succinogenes เป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสด้สูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ

ธนาสิน และสุภาพรรณ (2542) ได้ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสจากกระเพาะส่วนต้นของวัว โดยนำตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะส่วนต้นของวัวมาคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ด้วยอาหารวุ้นแข็ง RFCA บ่มที่อุณหภูมิ 37-39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ในตู้บ่มไร้อากาศ ได้เชื้อจุลินทรีย์ที่มี clear zone ล้อมรอบโคโลนี 14 สายพันธุ์ จากนั้นนำเชื้อไปทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสโดยใช้เทคนิค point inoculation บนอาหารแข็ง RFCA พบว่าสายพันธ์ที่ 5 และสายพันธ์ที่ 2 มีขนาดของ clear zone สูงที่สุด ตามลำดับ จากนั้นนำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มาศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส โดยเลี้ยงในอาหารที่มี CMC 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ 5 ให้ค่า CMCase สูงที่สุด คือ 8.991 U/ml ที่ระยะเวลา 12 วัน และเมื่อนำมาย้อมแกรมพบว่าเชื้อสายพันธุ์ที่ 5 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม เซลล์ต่อกันเป็นสาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Foong และคณะ (1997) ได้ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสจากกระเพาะวัว ในประเทศแคนนาดา ญี่ปุ่น อาร์เจติน่า และจากกระเพาะกระบือในประเทศมาเลเซีย พบเชื้อ *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* และ *Butyrivibrio sp.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

ชื่อเครื่องมือ	รุ่นและบริษัท	ประเทศผู้ผลิต
1. เครื่องเซนติฟิวส์ (Centrifuge)	Kontron	Italy
2. Spectrophotometer		
3. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)	Memmert	Germany
4. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง	OHAUS	America
5. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	Mettler PE 3000	Japan
6. เครื่องวัดพีเอช (pH meter)	Suntex	Taiwan
7. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)	Tomy ss-245	Japan
8. ตู้ปลอดเชื้อ		
9. ตู้บ่มเพาะเชื้อ	Thermotek	Japan
10. Anaerobic jar	Merck	German
11. Anaerocult	Merck	German
12. เครื่องปั่น (Blender)		
13. เตาไมโครเวฟ		
14. ปิ๊บ		
15. ปิเปต		
16. ลูกยาง		
17. ลวดเขี่ยเชื้อ		
18. ตะเกียงแอลกอฮอล์		
19. บีกเกอร์		
20. แท่งแก้วคน		
21. จานอาหารเลี้ยงเชื้อ		
22. หลอดทดลอง		
23. ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร		
24. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Petterson's media (ภาคผนวก ก)

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Rumen Fluid Cellulose Agar (RFCA) (ภาคผนวก ก)

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Rumen Fluid Cellulose Broth (RFCB) (ภาคผนวก ก)

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Mc beth's cellulose ammonium sulfate solution (ภาคผนวก ก)

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Nutrient agar (ภาคผนวก ก)

สารเคมีที่ใช้ในการจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ (ภาคผนวก ก)

สารละลาย Dinitrosalicylic acid (DNS) (ภาคผนวก ก)

0.1 M citrate buffer pH 4.8 (ภาคผนวก ก)

กรดไฮโดรคลอริก (HCl)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

Congo red

แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์

สัตว์ทดลอง

วัวพันธุ์ผสมระหว่าง พันธุ์ Holstein Fresian 75% กับ พันธุ์ Brahman 25% ระยะ 3 ปี จากคอกเลี้ยงสัตว์ของภาคเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

ก. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้

1. <u>การเก็บตัวอย่าง</u>

1.1 ของเหลวจากกระเพาะส่วนต้นของวัว

1.1.1 ทำการเก็บตัวอย่างหญ้าหมักจากกระเพาะส่วนต้นของวัว โดยทำการเก็บตัวอย่างในช่วงเวลาประมาณ 7.00 น. ก่อนการให้อาหาร โดยเปิดฝาข้างลำตัววัวที่มีการผ่าตัดเจาะทำเป็นช่องแคนนูลา (cannula) ไว้ในขวดที่ทำการฆ่าเชื้อไว้แล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.1.2 นำหญ้าหมักจากกระเพาะส่วนต้นของวัว มาทำการปั่นเป็นเวลา 3 นาที แล้วทำการกรองด้วยผ้าขาวบางหนา 4 ชั้น นำของเหลว (rumen fluid) ที่ได้มาใช้ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ต่อไป

1.2 มูลวัว

1.2.1 ทำการเก็บมูลวัวใส่ภาชนะที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว

1.2.2 ชั่งมูลวัว 10 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

1.2.3 นำส่วนผสมที่ได้ไว้ใช้ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ขั้นต่อไป

2. <u>การคัดเลือกขั้นที่หนึ่ง</u>

2.1 ของเหลวจากกระเพาะส่วนต้นของวัว

ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีองค์ประกอบของเซลลูโลสดังนี้

<u>วิธีที่ 1</u> ตามวิธีของ พิพัฒน์ ศรีเบญจลักษณ์

นำตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร RFCB ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาดกลาง นำไปบ่มเพาะเชื้อที่ตู้บ่มไร้อากาศ (anaerobic jar) อุณหภูมิ 39-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ลูปแตะเชื้อมา 1 ลูป แล้วทำการ streak ลงบนอาหาร RFCA จากนั้นทำการบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 39-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ในสภาพที่มีและไม่มีอากาศในตู้บ่มไร้อากาศ (anaerobic jar) โดยกลับจานเพาะเชื้อให้ด้านที่มีวุ้นอยู่ด้านบน แล้วทำการหาเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหาร

<u>วิธีที่ 2</u>

นำตัวอย่างมาทำการ streak ลงบนอาหาร Petterson's media และ RFCA เพื่อทำการแยกเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นทำการบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 39-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน และ 1 สัปดาห์ ตามลำดับ ในสภาพที่มีและไม่มีอากาศในตู้บ่มไร้อากาศ (anaerobic jar)

<u>วิธีที่ 3</u>

นำของเหลวที่ได้จากกระเพาะส่วนต้นของวัว มา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในหลอดอาหาร Mc beth's cellulose ammonium sulfate solution 9 มิลลิลิตร จำนวน 4 หลอด หลอดอาหาร 2 หลอด ให้อยู่ในสภาพไม่มีอากาศโดยเททับผิวหน้าอาหารด้วยพาราฟินเหลวที่ฆ่าเชื้อแล้ว ให้หนาประมาณ 2 เซนติเมตร บ่มหลอดอาหารที่อุณหภูมิ 39-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ตรวจดูหลอดอาหารที่มีการย่อยของกระดาษกรอง แสดงว่ามีแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 มูลวัว

ทำการแยกเชื้อในอาหารที่มีองค์ประกอบของเซลลูโลส เช่นเดียวกับการทดลองในข้อที่ 2.1 วิธีการที่ 2 และ 3 ตามลำดับ

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในขั้นที่หนึ่ง ทำการแยกให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารแข็งสูตร Petterson's media

3. การคัดเลือกขั้นที่สอง

นำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ มาเลี้ยงลงบนอาหารแข็งสูตร Carboxymethyl cellulose agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 39-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นราดทับด้วยสารละลาย congo red 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างออกด้วย 1 M NaCl เลือกเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่เกิดบริเวณวงใส (clear zone)

4. การคัดเลือกขั้นที่สาม

4.1 โดยเพาะเชื้อ 1 loop ลงในอาหาร carboxymethyl cellulose (CMC) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 39-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนติฟิวส์ (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) เพื่อใช้เป็น crude enzyme

4.2 จากนั้นทำการหาประสิทธิภาพของเอนไซม์โดยการย่อยสลาย carboxymethyl cellulose (CMC) (carboxymethyl cellulose degradating activity หรือ CMC degradating activity) ตามวิธีการของ Acebal (พรเทพ, 2538)

4.2.1 นำ crude enzyme มา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดสอบ

4.2.2 เติม 0.1 M citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และเติม 2 เปอร์เซ็นต์ Carboxymethyl cellulose (CMC) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

4.2.3 นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

4.2.4 เติมสารละลาย DNS reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

4.2.5 เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เทียบกับหลอดควบคุมที่เตรียมจาก 0.1 M citrate buffer pH 4.8 จากนั้นนำค่าดูดกืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่า unit of enzyme จากสูตรมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข. การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรีย

1. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ตรวจสอบการติดสีแกรม ขนาด รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์ การสร้างสปอร์ โดยการย้อมสีแกรมแล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

2. ศึกษาลักษณะการเจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ

ดูลักษณะโคโลนีที่ปรากฏบนผิววุ้น โดยสังเกตขนาดของโคโลนี รูปแบบ ส่วนสูง ผิว ขายขอบ ความสามารถในการให้แสงผ่าน ลักษณะสี

3. การศึกษาความสามารถในการเคลื่อนที่ (ดวงพร, 2537)

นำเชื้อแบคทีเรียที่มีอายุประมาณ 24 ชั่วโมง มา stab ลงในอาหาร motility test บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 39-40 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง ถ้าเชื้อกระจายจากแนวที่ stab ไว้ แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียมีความสามารถในการเคลื่อนที่

4. ตรวจความเป็น Facultative anaerobe และ Anaerobe (ดวงพร, 2537)

นำเชื้อแบคทีเรียที่จะทดสอบอายุประมาณ 24 ชั่วโมง stab ลงในอาหาร Hugh and Leifson's O-F medium 2 หลอด หลอดหนึ่งทำให้อยู่ในสภาพขาดอากาศโดยเททับผิวหน้าอาหารด้วยพาราฟินเหลวที่ฆ่าเชื้อแล้ว ให้หนาประมาณ 2 เซนติเมตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 39-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนอีกหลอดไม่ต้องเติมอะไร ตรวจผลโดยดูว่าเกิดกรดในหลอดอาหารในสภาพที่มีอากาศหรือไม่มีอากาศ หรือทั้งสองสภาพ ถ้าเกิดในหลอดที่เททับด้วยพาราฟินและไม่เทแสดงว่าเป็น fermentation แต่ถ้าเกิดเฉพาะในหลอดอาหารที่ไม่ได้เททับด้วยพาราฟินแสดงว่าเป็น oxidation การเกิดกรดแสดงให้ทราบโดยอาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นเหลือง

5. การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (ดวงพร, 2537)

- การย่อยแป้ง

ใช้เชื้อแบคทีเรียอายุ 24 ชั่วโมง มาเลี้ยงใน starch agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2-3 วัน หลังจากนั้นหยด gram iodine ลงบนอาหาร ถ้าเกิดบริเวณใสแสดงว่าผลการทดลองเป็นบวก คือแบคทีเรียมีความสามารถในการย่อยแป้งได้

- การสร้างเอนไซม์ Urease

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียอายุ 24 ชั่วโมง จาก nutrient agar ลงบน Christensen's urea agar slant ถ้าอาหารเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีชมพูแสดงว่า เชื้อแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ urease แสดงผลการทดสอบเป็นบวก

- การสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรตบางชนิด ในที่นี้ทดสอบ กลูโคส ซูโครส แลคโทส มอลโทส Cellobios

การทดสอบทำได้โดยใช้เชื้ออายุ 24-48 ชั่วโมง ปริมาณ 1 loopful ลงในหลอดอาหารทดสอบ ตรวจดูการเกิดก๊าซจากหลอดดักก๊าซ และการเกิดกรดจากการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์จากสีเขียวเป็นสีเหลือง แสดงว่าเชื้อนี้สามารถสร้างกรดจากน้ำตาลชนิดนั้นได้

- การย่อยเจลาติน

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียอายุ 24 ชั่วโมง ลงในอาหาร nutrient gelatin บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 39-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อย gelatin ได้ จะทำให้อาหารแข็งที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

- การสร้างอินโดล

นำเชื้อแบคทีเรียที่จะทดสอบไปเลี้ยงใน tryptone broth บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 39-40 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง หยดน้ำยา kovac ลงไป 2-3 หยด เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ ถ้าเกิดชั้นสีแดงลอยอยู่ แสดงว่าแบคทีเรียชนิดนั้นสามารถสร้างสารอินโดลได้

- การรีดิวซ์ไนเตรท

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่จะทดสอบในอาหาร nitrate broth บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 39-40 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ทดสอบโดยหยด sulfanilic acid และ ∝-napthylamine ถ้าเกิดสีแดงปนตะกอน แสดงว่าผลการทดสอบเป็นบวก ถ้าไม่เกิดสีแดงให้เติมผงสังกะสีลงไป ถ้าเกิดสีแดงขึ้นผลเป็นลบ แต่ถ้าไม่เกิดสี เนื่องจากไนเตรทถูกรีดิวซ์เป็นไนไตรท์ และก๊าซไนโตเจนโดยแบคทีเรีย แสดงว่าผลเป็นบวก

6. ทำการเทียบเคียงผลที่ได้กับ Bergey's mannuls of Systematic Bacteriology (Holt., ed., 1984-1989 เล่ม 1,2)

ค. การหาประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อแบคทีเรีย

1. การเลี้ยงเชื้อและเตรียม crude enzyme

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.1 การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียที่เกิดบริเวณวงใส โดยเพาะเชื้อลงในอาหารเหลว carboxymethyl cellulose (CMC) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 39-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

1.2 ดูดกล้าเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลวที่มี carboxymethyl cellulose 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 39-40 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน นำไปปั่นด้วยเครื่องเซนติฟิวส์ (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) เพื่อใช้เป็น crude enzyme ในการศึกษาต่อไป

2. การหาประสิทธิภาพของเอนไซม์โดยการย่อยสลาย carboxymethyl cellulose (CMC) (carboxymethyl cellulose degradating activity หรือ CMC degradating activity) ตามวิธีการของ Acebal (พรเทพ, 2538)

เช่นเดียวกับการทดลองในข้อที่ 4.2 ก

ง. การศึกษาการย่อยสลายเซลลูโลสโดยใช้วัตถุดิบธรรมชาติเป็นแหล่งคาร์บอน

1. นำหญ้าขนมาเป็นแหล่งคาร์บอน โดยนำมาทำการ pretreat และ non-pretreat ด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ NaOH จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วยน้ำจน pH เป็นกลาง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน ก่อนนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

2. จากนั้นทำการศึกษาการย่อยสลายเซลลูโลส 3 สภาวะ คือ pretreat 2 เปอร์เซ็นต์, pretreat 2 เปอร์เซ็นต์ แล้วเติม KH_2PO_4 0.5 เปอร์เซ็นต์, MgSO4.7H2O 0.05 เปอร์เซ็นต์, peptone 0.25 เปอร์เซ็นต์, yeast extract 0.075 เปอร์เซ็นต์ และสภาวะสุดท้ายคือ non-pretreat 2 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

3. เก็บตัวอย่างวันที่ 7 วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตรวจหา CMC degradating activities ของเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

ก. การหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด

ผลการหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในอาหาร 3 สูตร คือ Nutrient agar, Petterson's media และ Rumen Fluid Cellulose Agar (RFCA) ซึ่งสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด จากอาหาร 3 สูตร

อาหาร	ตัวอย่าง	Aerobe	Anaerobe
NA	Rumen	4.22×10^6	5.68×10^6
	มูล	2.51×10^7	1.68×10^7
Petterson's media	Rumen	4.10×10^6	2.32×10^6
	มูล	4.38×10^6	3.6×10^6
RFCA	Rumen	6.55×10^6	6.33×10^6
	มูล	6.10×10^6	8.53×10^6

หมายเหตุ : rumen หน่วยเป็น CFU/ml

มูลวัว หน่วยเป็น CFU/g

จากตารางจะเห็นว่าในอาหาร NA ในตัวอย่าง Rumen จะมีปริมาณจุลินทรีย์อยู่ในช่วง 10^6 CFU/ml และมูลวัว จะมีปริมาณจุลินทรีย์อยู่ในช่วง 10^7 CFU/g ซึ่งจะเห็นว่าในตัวอย่างมีปริมาณจุลินทรีย์อยู่เป็นจำนวนมาก ส่วนในอาหาร Petterson's media และ RFCA ซึ่งมีองค์ประกอบของเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน จะเห็นว่ามีจุลินทรีย์เกิดขึ้นบนอาหาร แสดงว่ามีจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสเกิดขึ้น

ข. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้

1. <u>ผลการการเก็บตัวอย่าง</u>

ทำการเก็บตัวอย่างจากวัวพันธุ์ผสมระหว่าง พันธุ์ Holstein Fresian 75% กับ พันธุ์ Brahman 25% ระยะ 3 ปี จำนวน 3 ตัว ผสมกัน จากคอกเลี้ยงสัตว์ของภาคเทคโนโลยีการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

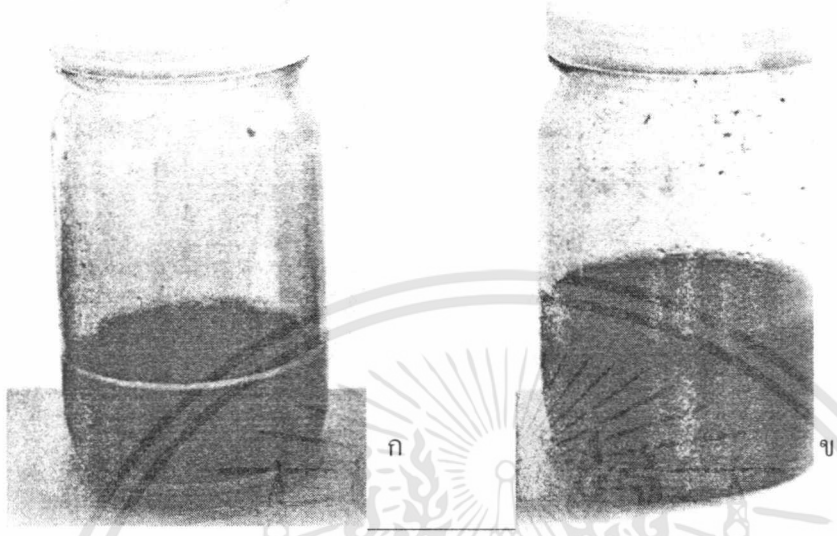
สัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เพื่อนำมาคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ โดยแบ่งการเก็บตัวอย่างเป็นจำนวน 3 ครั้ง โดยทำการเก็บตัวอย่างจาก Rumen และมูลวัว พบว่าการเก็บตัวอย่างอาหารจากกระเพาะส่วนต้นของวัว ซึ่งเก็บตัวอย่างหญ้าหมักโดยเปิดฝาข้างลำตัว (Cannula) ออก พบตัวอย่างหญ้าหมักมีสีเขียวอมเหลือง ดังแสดงในภาพที่ 6 ก และ ข จากนั้นทำการปั่นด้วยเครื่อง Blender เป็นเวลา 3 นาที แล้วกรองด้วยผ้าขาวบางหนา 4 ชั้น ได้ตัวอย่างของเหลวซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลวข้นๆ สีน้ำตาลอมเหลือง ดังภาพที่ 7ก ส่วนการเก็บตัวอย่างจากมูลวัว ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างมูลวัวมา 10 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นสเตอร์ไรด์ 90 มิลลิลิตร แล้วทำการเขย่าให้เข้ากัน พบว่าของเหลวที่ได้มีลักษณะเป็นสีน้ำตาลเข้ม ดังภาพที่ 7ข จากนั้นนำตัวอย่างของเหลวที่ได้ทั้ง 2 ตัวอย่างไปทำการคัดแยกเชื้อต่อไป

ภาพที่ 6 วิธีการเก็บตัวอย่างจากกระเพาะส่วนต้นของวัว

ก. การเก็บตัวอย่างหญ้าหมักโดยเปิดฝาแคนนูลาออก

ข. ตัวอย่างหญ้าหมักจากกระเพาะส่วนต้นของวัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 7 แสดงตัวอย่าง rumen fluid (ก) และมูลวัว (ข)

2. <u>ผลการคัดเลือกขั้นที่หนึ่ง</u>

จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารสูตร Petterson's media, RFCA และ Mc beth's cellulose ammonium sulfate solution แล้วทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 39-40 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งสิ้น 60 สายพันธุ์ โดยในอาหาร petterson's media ได้ทั้งหมด 4 สายพันธุ์ อาหาร RFCA ได้ทั้งหมด 28 สายพันธุ์ และในอาหาร Mc beth's cellulose ammonium sulfate solution ได้ทั้งหมด 29 สายพันธุ์ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส จาก Rumen และมูลวัว

สายพันธุ์ที่	ตัวอย่าง	อาหาร	สภาวะ	สีโคโลนี
1	Rumen	RFCA	Anaerobe	อมเหลือง
2	Rumen	RFCA	Anaerobe	ขาว
3	Rumen	RFCA	Anaerobe	ขาว
4	Rumen	RFCA	Anaerobe	ขาว
5	Rumen	RFCA	Anaerobe	ขาว
6	Rumen	RFCA	Anaerobe	เหลือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 (ต่อ)

สายพันธุ์ที่	ตัวอย่าง	อาหาร	สภาวะ	สีโคโลนี
7	Rumen	RFCA	Anaerobe	ขาวขุ่น
8	Rumen	RFCA	Anaerobe	ขาวขุ่น
9	Rumen	RFCA	Anaerobe	เหลือง
10	Rumen	RFCA	Anaerobe	น้ำตาล
11	Rumen	RFCA	Anaerobe	ขาวขุ่น
12	Rumen	RFCA	Anaerobe	เหลืองส้ม
13	Rumen	RFCA	Anaerobe	เหลืองอ่อน
14	Rumen	RFCA	Anaerobe	เหลืองขุ่น
15	มูล	RFCA	Aerobe	เหลืองเข้ม
16	Rumen	RFCA	Aerobe	เทา
17	Rumen	RFCA	Aerobe	เหลือง
18	มูล	Petterson's media	Aerobe	เหลือง
19	Rumen	Petterson's media	Anaerobe	ขาว
20	Rumen	Petterson's media	Anaerobe	ขาว
21	Rumen	Petterson's media	Anaerobe	ครีม
22	Rumen	RFCA	Aerobe	ขาว
23	Rumen	RFCA	Aerobe	ขาวเทา
24	Rumen	RFCA	Aerobe	ใส
25	Rumen	RFCA	Aerobe	เหลืองขุ่น
26/1	Rumen	RFCA	Aerobe	ส้ม
26/2	Rumen	RFCA	Aerobe	เหลืองขุ่น
27	มูล	RFCA	Aerobe	ขาวเหลือง
28	Rumen	RFCA	Aerobe	ไข่ไก่
29	Rumen	RFCA	Aerobe	ขาวเหลือง
30	มูล	RFCA	Aerobe	เหลือง
31	มูล	RFCA	Aerobe	ขาวเหลือง
32	มูล	Mc belt's	Aerobe	เหลือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 (ต่อ)

สายพันธุ์ที่	ตัวอย่าง	อาหาร	สภาวะ	สีโคโลนี
33	มูล	Mc belt's	Aerobe	ขาว
34	Rumen	Mc belt's	Aerobe	ขาวเหลือง
35	Rumen	Mc belt's	Aerobe	ขาวเหลือง
36	Rumen	Mc belt's	Aerobe	ขาว
37	Rumen	Mc belt's	Aerobe	เหลืองขุ่น
38	มูลวัว	Mc belt's	Aerobe	ขาวเหลือง
39	Rumen	Mc belt's	Aerobe	ขาวเหลือง
40	Rumen	Mc belt's	Aerobe	ขาวเหลือง
41	Rumen	Mc belt's	Aerobe	ขาวเหลือง
42	Rumen	Mc belt's	Aerobe	เหลืองขุ่น
43	Rumen	Mc belt's	Aerobe	ขาวเหลือง
44	Rumen	Mc belt's	Anaerobe	เหลืองขุ่น
45	มูล	Mc belt's	Anaerobe	ขาว
46	มูล	Mc belt's	Anaerobe	ขาวเหลือง
47	มูล	Mc belt's	Anaerobe	ขาว
48	มูล	Mc belt's	Anaerobe	ขาวเหลือง
49	มูล	Mc belt's	Anaerobe	ขาวเหลือง
50	มูล	Mc belt's	Anaerobe	ขาวเหลือง
51	มูล	Mc belt's	Anaerobe	ขาว
52	มูล	Mc belt's	Anaerobe	ขาวเหลือง
53	มูล	Mc belt's	Anaerobe	ขาว
54	มูล	Mc belt's	Anaerobe	เหลือง
55	Rumen	Mc belt's	Anaerobe	ขาวเหลือง
56	มูล	Mc belt's	Anaerobe	ขาว
57	Rumen	Mc belt's	Anaerobe	ขาว
58	มูล	Mc belt's	Anaerobe	ขาวเหลือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 (ต่อ)

สายพันธุ์ที่	ตัวอย่าง	อาหาร	สภาวะ	สีโคโลนี
59	มูล	Mc belt's	Anaerobe	ขาวเหลือง
60	มูล	Mc belt's	Anaerobe	ขาวเหลือง

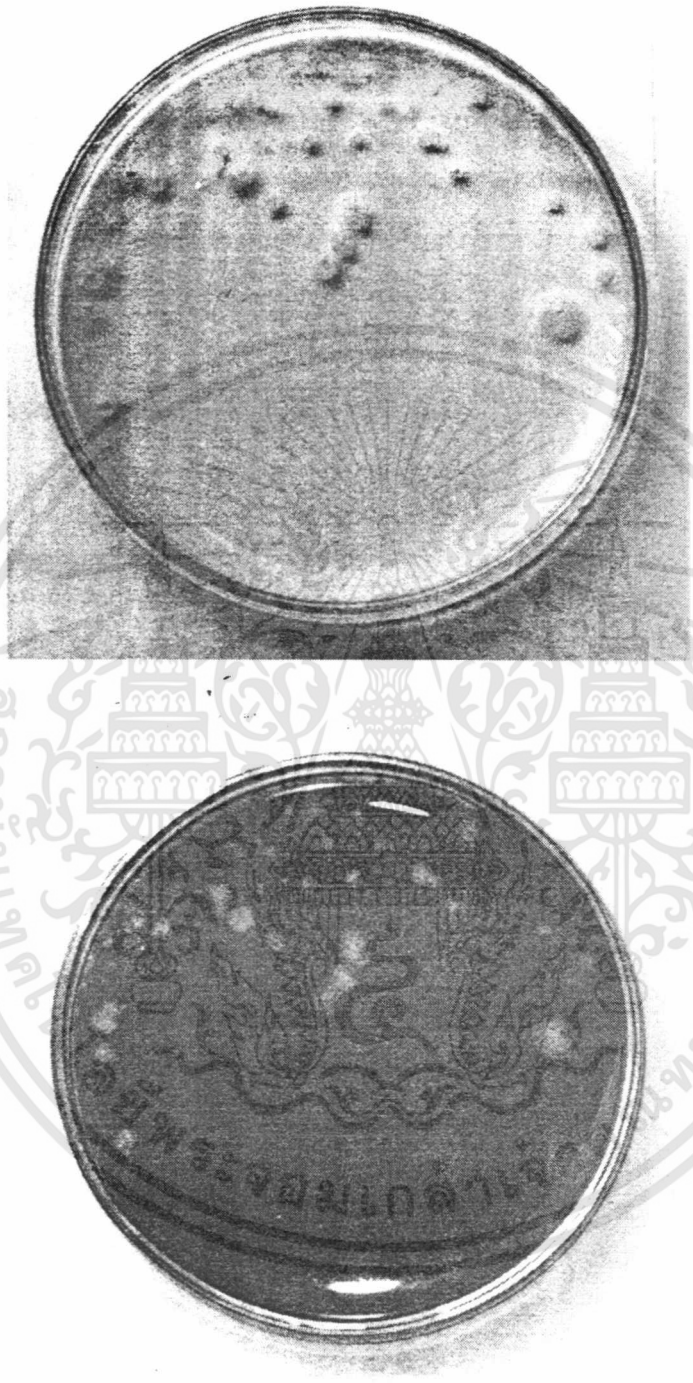
3. ผลการคัดเลือกขั้นที่สอง

โดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารแข็งสูตร CMC agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 39-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วราดทับด้วย congo red 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 8) ดูการเกิดบริเวณวงใส (clear zone) ดังตารางที่ 6 พบว่าเชื้อราที่ทำให้เกิดวงใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีทั้งสิ้น 41 สายพันธุ์ ที่เห็นได้ชัดที่สุดมีทั้งสิ้น 14 สายพันธุ์ แต่สายพันธุ์ที่ 57 ดูจากลักษณะโคโลนีพบว่าเชื้อเกิดการปนเปื้อนจึงไม่ได้นำมาศึกษาในขั้นต่อไป

4. ผลการคัดเลือกขั้นที่สาม

จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลวสูตร CMC บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 39-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน แล้วนำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนติฟิวส์ (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) เพื่อใช้เป็น crude enzyme จากนั้นทำการหาประสิทธิภาพของเอนไซม์โดยการย่อยสลาย carboxymethyl cellulose (CMC) จากตารางที่ 7 และภาพที่ 9 พบว่า เชื้อสายพันธุ์ที่ 45 มีประสิทธิภาพสูงที่สุด รองลงมาคือสายพันธุ์ที่ 50 ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ที่ 45 และ 50 ไว้ใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก

ภาพที่ 8 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร CMC agar เป็นเวลา 3 วัน

ก. ก่อนราดทับด้วย 0.1 เปอร์เซ็นต์ congo red

ข. หลังราดทับด้วย 0.1 เปอร์เซ็นต์ congo red

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 แสดงการเกิด/ความชัดของบริเวณวงใส (clear zone) ของเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ

สายพันธุ์ที่	การเกิด/ความชัด	สายพันธุ์ที่	การเกิด/ความชัด	สายพันธุ์ที่	การเกิด/ความชัด
1	-	22	+	41	-
2	-	23	-	42	-
3	-	24	++	43	+++
4	-	25	++	44	-
5	-	26/1	++	45	+++
6	+++	26/2	+	46	+++
7	+	27	+	47	-
8	+	28	++	48	+++
9	+++	29	-	49	++
10	-	30	+	50	+++
11	-	31	+	51	+++
12	-	32	++	52	+
13	+	33	+	53	+
14	-	34	+++	54	-
15	+	35	+++	55	++
16	-	36	+++	56	++
17	++	37	-	57	+++
18	-	38	+	58	+
19	+	39	+++	59	++
20	+	40	+	60	-
21	+++				

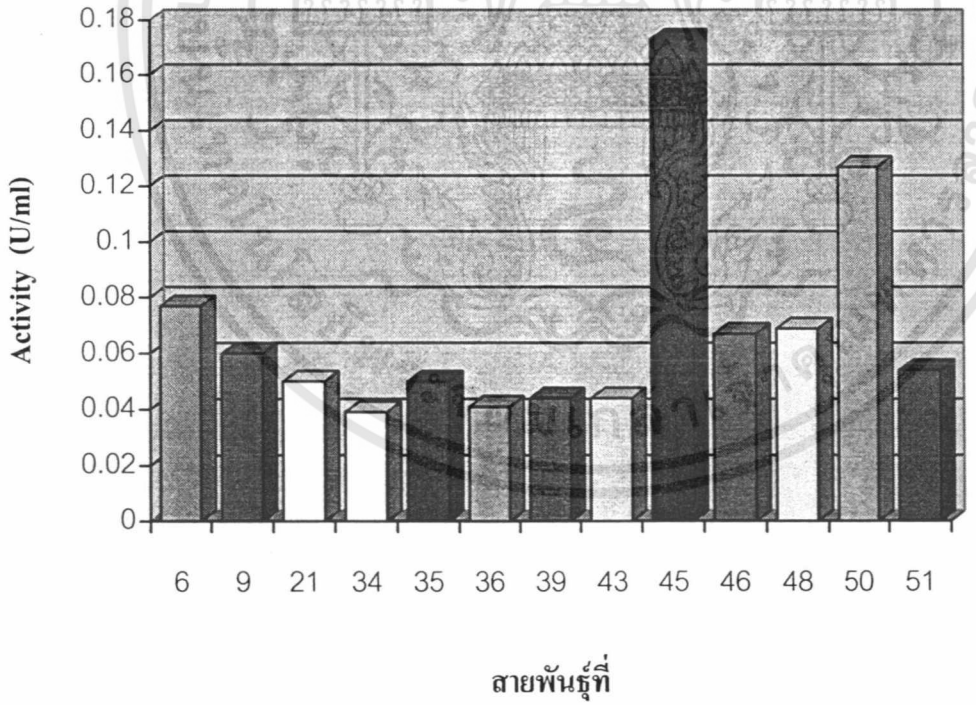
หมายเหตุ : - = ไม่เกิด

\+ = ระดับความชัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 แสดงประสิทธิภาพของเอนไซม์โดยการย่อยสลาย carboxymethyl cellulose (CMC) ที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

สายพันธุ์ที่	Carboxy Methyl Cellulose Activity (U/ml)	สายพันธุ์ที่	Carboxy Methyl Cellulose Activity (U/ml)
6	0.077	43	0.044
9	0.060	45	0.173
21	0.050	46	0.067
34	0.039	48	0.069
35	0.050	50	0.127
36	0.041	51	0.054
39	0.044		



ภาพที่ 9 กราฟแสดงประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ เป็นเวลา 5 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค. ผลการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรีย

ผลการจำแนกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 45 และ 50 แสดงได้ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงผลการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย สายพันธุ์ที่ 45 และ 50

	เชื้อที่ 45	เชื้อที่ 50
Gram	+	+
ขนาด	3-9 mm	2-8 mm
รูปร่าง	Cocci	Cocci
ลักษณะการจัดเรียงตัว	เดี่ยว คู่	กลุ่ม
รูปแบบ	กลม	กลม
สี	ขาว	ขาวเหลือง
ส่วนสูง	โค้งนูน	โค้งนูน
ผิว	เรียบ	เรียบ
ชายขอบ	เรียบ	เรียบ
Motility test	-	-
การใช้อากาศ	Facultative Anaerobe	Facultative Anaerobe
Catalase	+	+
Starch	-	-
Urease	+	+
การสร้างกรด		
- Glucose	+	+
- Sucrose	+	+
- Lactose	+	+
- Fructose	+	+
- Moltose	+	+
- Cellobiose	+	+
- Mannose	+	+
- Mannitol	+	+
- Xylose	+	+
Gelatin	-	-
Indole	-	-
Nitrate	+	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 8 นำผลการทดลองที่ได้ไปทำการเทียบเคียงกับ Bergey mannul of Systemmatic พบว่าเชื้อสายพันธุ์ที่ 45 และ 50 น่าจะเป็นเชื้อในสกุลของ *Staphylococcus sp.* เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมีรูปร่างกลม แกรมบวก และสามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในสภาวะมีอากาศและไม่มีอากาศ จากข้อมูลดังกล่าวจัดอยู่ใน section ที่ 12 Gram-positive cocci ตามหนังสือ Bergey mannul of Systemmatic เล่ม 2 และจากผลการทดสอบ Catalase พบว่าเชื้อทั้งสองชนิดสามารถสร้าง Catalase ได้ ดังนั้นเชื้อทั้งสองสายพันธุ์น่าจะเป็นเชื้อในสกุลของ *Staphylococcus sp.* เพราะเชื้อในสกุลของ *Ruminococcus sp.* และ *streptococci sp.* จะไม่สามารถสร้าง catalase ได้ และเชื้อดังกล่าวก็ไม่น่าจะใช่เชื้อ *Micrococcus sp.* เนื่องจากการทดสอบน้ำตาลกลูโคส พบว่าเชื้อสามารถสร้างกรดและแก๊สได้ แต่เชื้อ *Micrococcus sp.* จะสามารถสร้างกรดในน้ำตาลกลูโคสได้ แต่จะไม่สร้างแก๊ส

จากที่ได้มีการศึกษาข้อมูลเบื้องต้น ไม่มีการรายงานว่าพบเชื้อแบคทีเรียในสกุลของ *Staphylococcus sp.* ในกระเพาะรูเมน ซึ่งทำให้สันนิฐานได้ว่า เชื้อสองสายพันธุ์นี้อาจจะเกิดการปนเปื้อนมาจากน้ำหรือหญ้าที่วัวกินเข้าไป และจากการตรวจสอบในตารางที่ 5 พบว่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์นี้แยกได้มาจากมูลวัว ดังนั้นเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวอาจจะปนเปื้อนมาจากอากาศก็เป็นได้

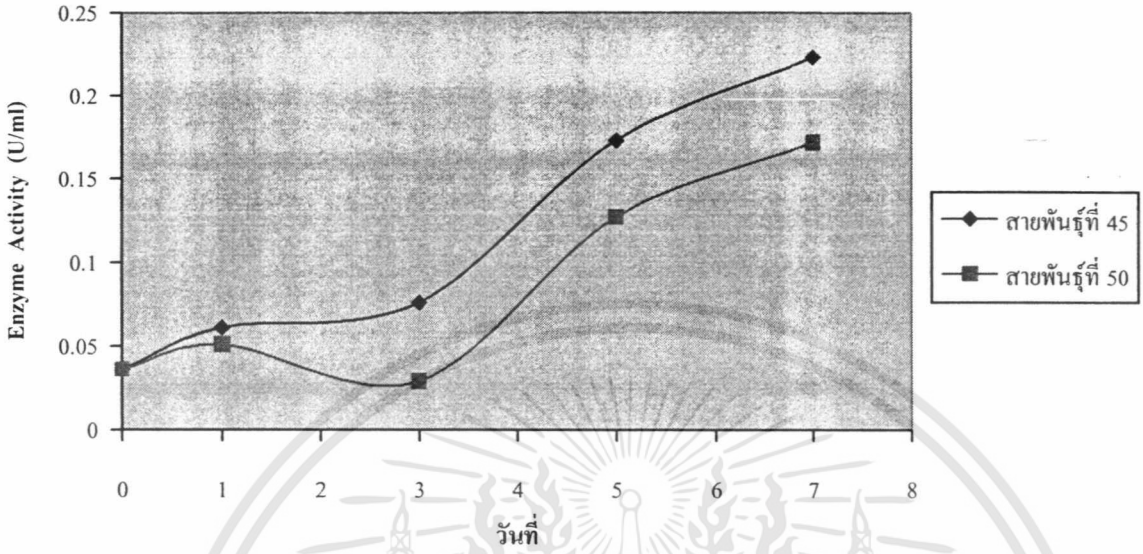
ง. ผลการหาประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 45 และ 50 ที่คัดเลือก มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี carboxymethyl cellulose 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 39-40 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนติฟิวส์ (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) เพื่อใช้เป็น crude enzyme จากนั้นทำการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายเซลลูโลส ได้ผลดังตารางที่ 9 และภาพที่ 10

ตารางที่ 9 แสดงประสิทธิภาพของเอนไซม์โดยการย่อยสลาย carboxymethyl cellulose (CMC) ที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

สายพันธุ์ที่	Carboxy Methyl Cellulose Activity (U/ml)				
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7
45	0.036	0.061	0.076	0.173	0.223
50	0.036	0.051	0.029	0.127	0.172

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

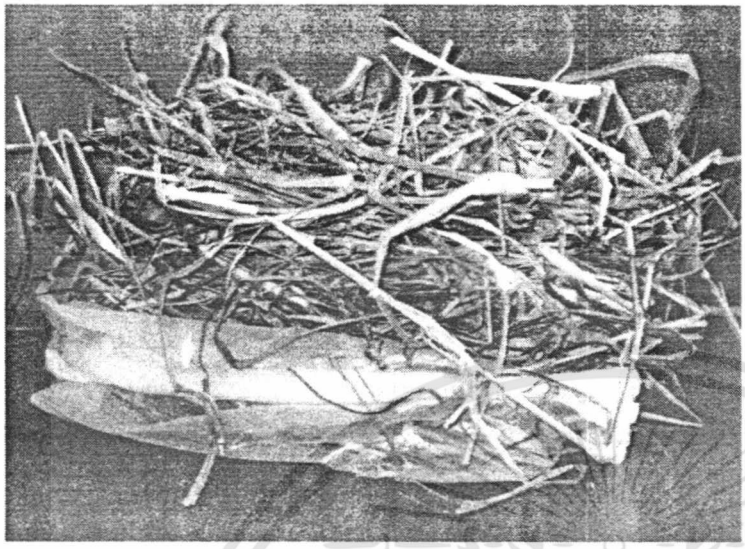


ภาพที่ 10 กราฟแสดงประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

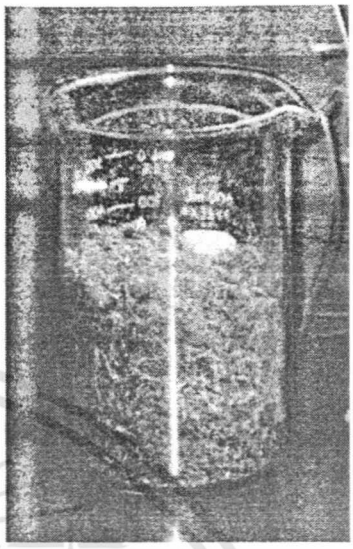
จ. การศึกษาการย่อยสลายเซลลูโลสโดยใช้วัตถุดิบธรรมชาติเป็นแหล่งคาร์บอน

ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อที่คัดเลือกได้ โดยใช้หญ้าขนเป็นแหล่งคาร์บอนแทน Carboxymethyl cellulose โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างหญ้าขนที่ผ่านการ pretreat 2 เปอร์เซ็นต์, หญ้าขนที่ผ่านการ pretreat 2 เปอร์เซ็นต์ แล้วมีสารอาหารอื่นๆเป็นองค์ประกอบคือ KH_2PO_4 0.5 เปอร์เซ็นต์ $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 เปอร์เซ็นต์ peptone 0.25 เปอร์เซ็นต์ และ yeast extract 0.075 เปอร์เซ็นต์ และ หญ้าขนที่ไม่ผ่านการ pretreat โดยวิธีการ pretreat หญ้าขน คือนำหญ้าขนแห้งแช่ใน 10 เปอร์เซ็นต์ NaOH นึ่งในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อเย็นแล้วล้างด้วยน้ำจน pH เป็นกลาง อบให้แห้งดังภาพที่ 11 จากนั้นนำมาปั่นให้ละเอียดแล้วนำเตรียมอาหารตามสูตรต่างๆ ส่วนหญ้าขนที่ไม่ได้ผ่านการ pretreat ก็นำมาปั่นและเตรียมอาหารได้เลย จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 39-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำไปทำการ centrifuge ที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และ CMC degradating activities ของเอนไซม์ ผลการทดลองแสดงได้ในตารางที่ 10

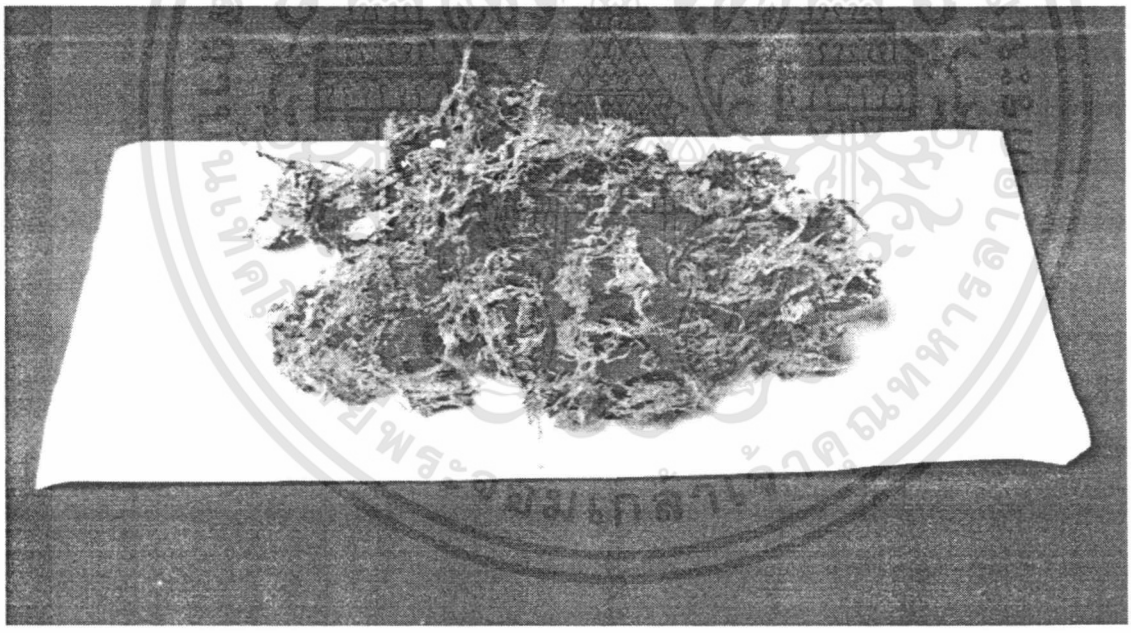
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก



ข



ค

ภาพที่ 11 แสดงหญ้าขนที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเตรียมตัวอย่าง

ก. หญ้าขนแห้ง

ข. หญ้าขนแห้งที่ทำการปั่นเรียบร้อยแล้ว

ค. หญ้าขนแห้งที่ผ่านการ pretreat แล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 10 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูโลสของเชื้อสายพันธุ์ที่ 45 และ 50 ในการย่อยวัตถุดิบจากธรรมชาติ เป็นเวลา 7 วัน

สายพันธุ์	Pretreat --		Pretreat พร้อมสารอาหาร		Non - Pretreat	
	น้ำตาลกลูโคส (mg/ml)	Unit of enzyme (U/ml)	น้ำตาลกลูโคส (mg/ml)	Unit of enzyme (U/ml)	น้ำตาลกลูโคส (mg/ml)	Unit of enzyme (U/ml)
45	0.015	0.016	0.020	0.017	0.010	0.012
50	0.014	0.011	0.016	0.014	0.007	0.011

ปรากฏว่าเชื้อที่เลี้ยงในหญ้าขนที่ไม่ได้ผ่านการ pretreat ให้ค่า น้ำตาลรีดิวซ์ และค่า CMC degradating activities ต่ำที่สุด ขณะที่เชื้อที่เลี้ยงในหญ้าขนที่ผ่านการ pretreat และมีสารอาหารอยู่ด้วยจะให้ค่าน้ำตาลรีดิวซ์ และค่า CMC degradating activities สูงที่สุด แสดงว่าการ pretreat หญ้าขนมีความสำคัญต่อการย่อยสลายโดยเอนไซม์มาก เพราะหญ้าขนที่ไม่ได้ผ่านการ pretreat อาจจะมีสารประกอบอื่นๆที่ย่อยสลายได้ยาก เช่น lignin hemicellulose เป็นต้น ซึ่งขัดขวางการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเซลลูโลสในหญ้าขน ทำให้เซลลูโลสถูกใช้ได้น้อย เชื้อจึงเจริญและสร้างเอนไซม์ได้น้อยด้วย ส่วนหญ้าขนที่ผ่านการ pretreat จะย่อยสลายเซลลูโลสได้น้อยกว่าหญ้าขนที่ผ่านการ pretreat และมีสารอาหารอื่นๆเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย อาจเนื่องมาจากในการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อ ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆอีก เช่น แหล่งไนโตรเจน ธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรอง ทำให้เซลลูโลสถูกใช้ได้น้อยกว่า เชื้อจึงเจริญและสร้างเอนไซม์ได้น้อยกว่าด้วย ดังนั้นหญ้าขนที่ผ่านการ pretreat และมีสารอาหารอื่นๆเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย จึงเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส จากกระเพาะส่วนต้นของวัวและมูลวัว สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1. จากการการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส พบว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 45 และ 50 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูง โดยพบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองเป็นเชื้อที่ได้มาจากตัวอย่างมูลวัว โดยคาดว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวน่าจะเป็นเชื้อแบคทีเรียในสกุลของ *Staphylococcus sp.* เมื่อทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

2. จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส พบว่า เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 45 และ 50 จะให้ค่า Carboxymethyl cellulose activity เท่ากับ 0.223 และ0.173 Unit/ml ตามลำดับ เมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน

3. ผลการศึกษาการใช้วัตถุดิบธรรมชาติเป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะ 3 สภาวะ ปรากฏว่าสภาวะที่ทำการ pretreat หญ้าขนและมีสารอาหารเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย จะผลิตเอนไซม์ที่ให้ค่า CMCase มากที่สุด รองลงมาคือ หญ้าขนที่ผ่านการ pretreat แต่ไม่มีสารอาหารอื่นเป็นองค์ประกอบ ส่วนหญ้าขนที่ไม่ผ่านการ pretreat จะผลิตเอนไซม์ที่ให้ค่า CMCase ต่ำที่สุด

จากการศึกษา ทำให้สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสจากกระเพาะส่วนต้นของวัวและมูลวัว โดยทำการเลี้ยงในอาหารที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบและเป็นแนวทางหนึ่งในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการเพิ่มคุณค่าของวัตถุดิบเหลือทิ้งจากการเกษตรต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้เพิ่มเติม เพื่อระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียให้ชัดเจนยิ่งขึ้น

2. จากการศึกษาการย่อยสลายวัตถุดิบจากธรรมชาติ พบว่าในวันที่ 7 ยังมีการย่อยสลายของเซลลูโลสน้อยมาก อาจเนื่องจากเชื้อยังทำการปรับสภาวะอยู่ จึงควรเพิ่มระยะเวลาในการศึกษาให้มากขึ้น

3. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ โดยทำการศึกษาอุณหภูมิ pH การให้อากาศ เพื่อเป็นการเพิ่มกิจกรรมการย่อยสลายของเซลลูโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ดวงพร คันธโชติ. 2537. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. กรุงเทพ. : โอ.เอส.พริ้นติ้ง เฮาส์.

ธนาสิน ธนอนันต์โชค และสุภาพรรณ โรจน์อัมพร. 2542. การศึกษาเบื้องต้นในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสจากกระเพาะส่วนต้นของวัว. ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

นวลพรรณ ณ ระนอง. 2524. บักเตรีพวกเฮเทอโรโทรปที่ต้องการอากาศและบักเตรีที่มีบทบาทในการย่อยสลายเซลลูโลสในป่าชายเลน อ.ขลุง จ.จันทบุรี. วิทยานิพันธ์ สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2527. โภชนศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง. ภาควิชาสัตวบาล. คณะเกษตรศาสตร์. เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2543. เอ็นไซม์ทางอาหาร. ครั้งที่3. กรุงเทพ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พรทิพย์ ตัณฑ์เจริญรัตน์. 2528. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อ แอคติโนมัยสีทรหัส 24402. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรเทพ ถนนแก้ว. 2538. ภาวะเหมาะสมของการผลิตเซลลูเลสจากเชื้อราที่คัดแยกจากบริเวณปลูกป่าศรนารายณ์ *Agave sisalana* Perrine. วิทยานิพนธ์บัณฑิตวิทยาลัย ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พิพัฒน์ ศรีเบญจลักษณ์. 2527. การผลิตชีวก๊าซจากเซลลูโลสโดยใช้เชื้อคู่. วิทยานิพนธ์บัณฑิตวิทยาลัย สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เมธา วรรณพัฒน์. 2529. โภชนาศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ฟันนี่พับบลิชชิ่ง. กรุงเทพ.

ภาควิชาชีววิทยา. คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

สุวรรณา ภูวนวิทยาคม. 2528. แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยเศษพืช. วิทยานิพนธ์. สาขาวิชาปฐพีวิทยา. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุนทร วงศ์สวัสดี. 2516. การแยกเชื้อราและศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสของเชื้อรา. วิทนานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Alexander, J.K., 1961. Characteristics of cellulose phosphorylase. Journal of Bacteriology. 81(6) : 903-910

Beguin, P., and Aubert, J-P. 1992. Encyclopedia of Microbiology vol 1 A-C. Sandiego : Academic press, inc.

Foong, C.,Kuo, J., Norhani, A., Yin, W., Syed, J., Mutsmis., Takafumi, N., Critona, A., and Hiroshi, K. 1997. Selective Isolation and Characterization of Cellulolytic Bacteria by Cellulose Enrichment. JIRCAS J. 5 : 79-89.

Holt, John G, ed. 1984-1989. Bergey's mannuls of Systematic Bacteriology. United state of America. : Williams & Wilkins

Hungate, R.E. 1947. Studies on cellulose fermentation III. The culture and isolation of cellulose-decomposing bacteria from the rumen of cattle. Journal of Bacteriology 53 : 631-645

Lee, J.H., Pagan, R.J., and Rogers, P.L. 1983. Continous simultaneous saccharification and fermentation of starch using *Zymomonas mobilis*. Biotechnology and Bioengineering 25 : 659-669.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

Rumen Fluid Cellulose Agar (RFCA)

Inorganic Salt Solution	200	มิลลิลิตร
Resazurin (0.1% Solution)	0.5	มิลลิลิตร
Rumen Fluid	75	มิลลิลิตร
Cellulose	7	กรัม
Cystein Hydrochloride	0.05	กรัม
Bacto Agar	7.5	กรัม
Distilled Water	224.5	มิลลิลิตร
Final pH 7.0		

Rumen Fluid Cellulose Broth (RFCB)

Inorganic Salt Solution	200	มิลลิลิตร
Resazurin (0.1% Solution)	0.5	มิลลิลิตร
Rumen Fluid	75	มิลลิลิตร
Cellulose	7	กรัม
Cystein Hydrochloride	0.05	กรัม
Distilled Water	224.5	มิลลิลิตร
Final pH 7.0		

Inorganic Salt Solution

$(NH4)_2SO_4$	1.25	กรัม
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	44.09	กรัม
KH_2PO_4	11.18	กรัม
$CaCl_2$	0.125	กรัม
$MgSO_4$	0.125	กรัม
NaCl	2.5	กรัม
Distilled Water	1000	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการเตรียม RFCA, RFCB และ CB

1. ใส่ส่วนประกอบต่างๆ ลงไปตามสูตรอาหารที่มีให้ ยกเว้น cysteine hydrochloride ลงในบีกเกอร์ 1000 มิลลิลิตร
2. คนส่วนประกอบต่างๆให้เข้ากัน แล้วนำไปตั้งไฟต้มให้เดือด
3. ระหว่าการต้มให้ใส่ cysteine hydrochloride ลงไปต้มให้ส่วนประกอบต่างๆ ละลายหมด
4. นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที โดยภาชนะที่ใส่จะต้องคลุมด้วยผ้า หรือ กระดาษฟรอยด์ เพื่อป้องกันแสง
5. ก่อนจะนำอาหาร RFCA, RFCB ไปใช้ควรมีการทำทิ้งไว้ค้างคืนก่อน 1 คืน

Nutrient agar (ดวงพร คันธโชติ, 2537)

Bcef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

Petterson's media (สุวรรณา ภูวนวิทยาคม, 2528)

Cellulose power	6.0	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	2.0	กรัม
K_2HPO_4	0.6	กรัม
KH_2PO_4	0.4	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	กรัม
Ferric citrate	10.0	มิลลิกรัม
$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	4.4	มิลลิกรัม
$MnSO_4 \cdot 4 H_2O$	5.0	มิลลิกรัม
$CaCl_2$	55.0	มิลลิกรัม
$CoCl_2 \cdot 6 H_2O$	1.0	มิลลิกรัม
Thiamine hydroclorisde	100	มิลลิกรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
Agar	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mc Beth's cellulose ammonium sulfate solution

Dipotassium phosphate (K_2HPO_4)	1.0	กรัม
Magnesium sulfate ($MgSO_4 . 7H_2O$)	1.0	กรัม
Sodium carbonate	1.0	กรัม
Ammonium sulfate ($(NH_4)_2SO_4$)	2.0	กรัม
Calcium carbonate	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

กระดาษกรองที่ตัดเป็นชิ้นๆขนาด 1×5 เซนติเมตร

นำส่วนผสมแต่ละอย่างละลายในน้ำกลั่น แล้วเทใส่หลอดที่ใส่กระดาษกรองไว้ก่อน ขณะที่เทแบ่งใส่หลอดทดลองให้เขย่าส่วนผสมก่อน เพื่อไม่ให้ Calcium carbonate ตกตะกอนแล้วนำไปฆ่าเชื้อ โดยใช้ autoclave ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 30 นาที

Carboxymethyl cellulose (CMC) (พรทิพย์ ตัณฑ์เจริญรัตน์, 2528)

Carboxymethyl cellulose	10.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
KH_2PO_4	2.0	กรัม
$MgSO_4 . 7H_2O$	5.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

Carboxymethyl cellulose agar (พรเทพ ถนนแก้ว, 2538)

Carboxymethyl cellulose	5.0	กรัม
$(NH4)_2SO_4$	1.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Agar	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลาย Carboxymethyl cellulose (CMC) ในน้ำอุ่น 500 มิลลิลิตร โดยใส่ CMC ทีละน้อยๆ พร้อมกับการคนตลอดเวลา จนกระทั่ง CMC ละลายหมด ละลายส่วนผสมที่เหลือ แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Motolity test medium (ดวงพร คันธโชติ, 2537)

Tryptone	10.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Agar	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

Glucose O.F medium (Semisolid), pH 6.6-7.0 (ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศิลปากร)

Peptone	2.0	กรัม
Glucose (dextrose)	10	กรัม
K_2HPO_4	0.3	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Agar	2.0-3.0	กรัม
Bromthymol blue	0.03-0.08	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

เตรียมเป็น semisolid agar tall และ autoclave 110 องศาเซลเซียส 20 นาที

Starch agar (ดวงพร คันธโชติ, 2537)

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Potato starch	10.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

Tryptone broth (ดวงพร คันธโชติ, 2537)

Tryptone	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

Nutrient gelatin medium (ดวงพร คันธโชติ, 2537)

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Gelatin	120.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fermentation Carbohydrate medium (ดวงพร คันธโชติ, 2537)

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
น้ำตาล	10.0	กรัม
Bromthymol blue	0.03-0.08	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

PH 6.8-7.0

ทำการละลายอาหารยกเว้นน้ำตาล นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เตรียมน้ำตาลแต่ละชนิดโดยการกรอง แล้วใช้ปิเปตที่ฆ่าเชื้อแล้ว ดูดน้ำตาลใส่หลอดทดสอบ

Christensen's urea agar medium pH 6.6-7.0 (ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศิลปากร)

A. Urea broth base

Peptone	1.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
KH_2PO_4	2.0	กรัม
Glucose (dextrose)	1.0	กรัม
Phenol red (กรดสีเหลือง ด่างสีแดง)	0.012	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร โดยต้มในอ่างน้ำเดือดให้วุ้นละลาย แล้ว autoclave ให้อุณหภูมิประมาณ 60-70 องศาเซลเซียส

B. 20% Urea solution

ละลาย urea 20 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองผ่านแผ่นกรองที่มีรู 0.45 μm

ผสม B (100 มิลลิลิตร) และ A (900 มิลลิลิตร) จนเข้ากันดี แล้วเทใส่หลอดปลอดเชื้อ 3-4 มิลลิลิตรต่อหลอด ด้วย aseptic technique ใน larminar flow เอียงเป็น agar slant ทันที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nitrate broth (ดวงพร คันธโชติ, 2537)

Bacto-Beef extract	3.0	กรัม
Bacto-Peptone	5.0	กรัม
Potassium nitrate	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

2. การเตรียมน้ำยาเคมีที่ใช้ทดสอบ

การเตรียมสารละลาย DNS (Dinitrosalicylic acis) (พรเทพ ถนนแก้ว, 2538)

1. เตรียมสารละลาย NaOH 10 % ปริมาตร 22 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในสารละลาย phenol 10 กรัม เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน เทแบ่งออกมา 96 มิลลิลิตร เติม $NaHSO_3$ 9.6 กรัม คนให้เข้ากัน
2. เตรียมสารละลาย DNS 1 % ปริมาตร 880 มิลลิลิตร และเตรียมสารละลาย Rochell salt 255 กรัม ด้วยสารละลาย NaOH 4.5 % ปริมาตร 300 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเทรวมกับสารละลาย DNS 1 % คนให้เข้ากัน
3. นำสารละลายที่ได้จากข้อ 1 และ 2 มารวมกัน ก็จะได้สารละลาย DNS สารละลายนี้ต้องใส่ไว้ในขวดสีชา แล้วนำไปใส่ในตู้เย็นอย่างน้อย 1 คืน จึงจะนำไปใช้

การเตรียม 0.1 M citrate buffer pH 4.8 (พรเทพ ถนนแก้ว, 2538)

1. ชั่ง sodium citrate มา 29.42 กรัม ละลายในน้ำกลั่นเล็กน้อย
2. เติม 1 M HCl ลงไป 70 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน
3. เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน

การเตรียม 1 M HCl (พรเทพ ถนนแก้ว, 2538)

ตวง HCl เข้มข้นมา 97.33 มิลลิลิตร เติมน้ำ 500 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน จากนั้นปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

การเตรียม 1 M NaOH

ชั่ง NaOH มา 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน จากนั้นปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nitrate test solution

Sulphanilic acid	0.8	กรัม
5 N acetic acid	100	มิลลิลิตร

ละลาย Sulphanilic acid ใน 5 N acetic acid โดยใช้ความร้อน

3. การทำกราฟมาตรฐานของน้ำตาล (พรเทพ ถนนแก้ว, 2538)

1. เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสให้มีความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ใส่ในหลอดทดสอบ
2. เติมสารละลาย DNS ลงไปหลอดละ 3 มิลลิลิตร นำไปตั้งในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งไว้ให้เย็น
3. เติมน้ำกลั่นลงไปทุกหลอดๆละ 10 มิลลิลิตร
4. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟระหว่างค่าดูดกลืนแสง (OD) กับปริมาณน้ำตาลกลูโคส

4. คำนวณหาค่า unit of enzyme ตามวิธีการของ The International Union of Biochemistry

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดสอบ

นั่นคือ

1 หน่วยของเอนไซม์ = 1 u mole ของสับสเตรทที่ถูกย่อยใน 1 นาที

= 1 u mole ของกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที

= 0.180 มิลลิกรัม กลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที

ในกรณีการคำนวณ CMCase จะได้ว่า

ถ้า 0.180 มิลลิกรัม กลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที มีค่า = 1 หน่วย

1.000 มิลลิกรัม กลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 10 นาที มีค่า $= \frac{1}{0.180 \times 10}$ หน่วย

มีค่า = 0.555

สมมุติปลดปล่อยกลูโคส x มิลลิกรัม ใน 10 นาที มีค่า = (x) × (0.555) หน่วย

จากการทดลองใช้เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร = (x) × (0.555) หน่วย

ถ้าใช้เอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร $= \frac{(x) \times (0.555)}{0.5}$ หน่วย

$$\text{หรือ} = \frac{(\text{มิลลิกรัมกลูโคส}) \times (0.555)}{\text{มิลลิลิตรของเอนไซม์}} = \text{หน่วย/มิลลิลิตร}$$

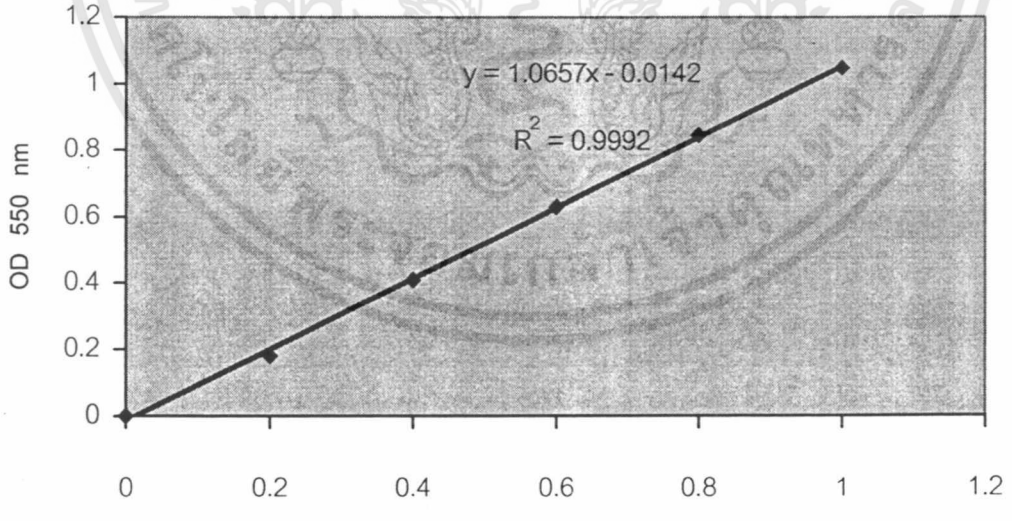
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

1. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

ตารางที่ 11 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ของสารละลายกลูโคส

สารละลายน้ำตาลกลูโคส (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm (OD 550 nm)
0	0
0.2	0.181
0.4	0.408
0.6	0.628
0.8	0.846
1.0	1.049



ภาพที่ 12 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ของสารละลายน้ำตาลกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือก

สายพันธุ์ที่ 45

ตารางที่ 12 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 45 ที่คัดเลือกได้จากกระเพาะส่วนต้นของวัว และมูลวัว

เวลา (วัน)	น้ำตาลกลูโคส		Unit of enzyme* (U/ml)
	OD 550 nm	มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	
0	0.020	0.032	0.036
1	0.044	0.055	0.061
3	0.058	0.068	0.076
5	0.152	0.156	0.173
7	0.200	0.201	0.223

สูตรหาค่า Unit of enzyme = $\frac{X \times 0.555}{0.5}$

กำหนดให้ X คือ ค่าความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

สายพันธุ์ที่ 50

ตารางที่ 13 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 50 ที่คัดเลือกได้จากกระเพาะส่วนต้นของวัว และมูลวัว

เวลา (วัน)	น้ำตาลกลูโคส		Unit of enzyme* (U/ml)
	OD 550 nm	มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	
0	0.020	0.032	0.036
1	0.035	0.046	0.051
3	0.014	0.027	0.029
5	0.107	0.114	0.127
7	0.151	0.155	0.172

สูตรหาค่า Unit of enzyme = $\frac{X \times 0.555}{0.5}$

กำหนดให้ X คือ ค่าความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นางสาวสุฤทัย ล้ำประเสริฐ ชื่อเล่น จู เกิดเมื่อวันที่ 24 สิงหาคม 2522 เป็นชาวจังหวัดกรุงเทพมหานครโดยกำเนิด ประวัติการศึกษา จบชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนวัดประดู่ในทรงธรรม ปัจจุบันศึกษาอยู่ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมัก คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ระดับปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีการหมัก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้