16673

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาเบื้องต้นในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส จากกระเพาะส่วนต้นของวัว

(Screening of Cellulase Producing Microorganisms from Rumen Fluid of Cow)

T096512

นายธนาสิน ธนอนันต์โชค

นางสาวสุภาพรรณ โรจน์อัมพร

ปพ.
ส255ก
2543

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....23512.....
วัน,เดือน,ปี.....

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การศึกษาเบื้องต้นในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส
จากกระเพาะส่วนต้นของวัว
(Screening of Cellulase Producing Microorganisms from
Rumen Fluid of Cow)

โดย

นายธนาสิน ธนอนันต์โชค
นางสาวสุภาพรรณ โรจน์อัมพร

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

..... 18 /เม.ย./ 43 อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ
(นางสาวอรพินท์ วงศ์เจริญสวัสดิ์)

..... 18 /เม.ย./ 43 อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
( )

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร
.....
( )
หัวหน้าภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

16673
- 6 ก.ค. 2543
ปพ
ธ 2551
2542

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ธนาสิน ธนอนันต์โชค และสุภาพรรณ โรจน์อัมพร, 2543 : การศึกษาเบื้องต้นในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสจากกระเพาะส่วนต้นของวัว ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์อัชชา วงศ์เจริญสถิตย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : อาจารย์นิตยา พิระภัทรุ่งสุริยา

การทดลองได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสจากกระเพาะส่วนต้นของวัว โดยนำตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะส่วนต้นของวัว มาคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ด้วยอาหารวุ้นแข็ง RFCA (Rumen Fluid Cellulose Agar) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37-39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ในตู้บ่มไร้อากาศได้เชื้อจุลินทรีย์ที่มี clear zone ล้อมรอบโคโลนีทั้งสิ้น 14 สายพันธุ์ นำเชื้อดังกล่าวไปทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสโดยใช้เทคนิค point inoculation บนอาหารวุ้นแข็ง RFCA พบว่าสายพันธุ์ที่มีอัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลาง clear zone ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีสูงสุดคือสายพันธุ์ที่ 5 รองลงมาคือสายพันธุ์ที่ 2 จากนั้นนำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกมาศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสโดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี CMC (Carboxy Methyl Cellulose) 1.0% เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มในตู้บ่มเชื้อสภาพไร้อากาศอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1, 3, 5, 7, 9 และ 12 วัน พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุดคือ สายพันธุ์ที่ 5 โดยให้ค่า CMCase เท่ากับ 8.991 U/ml ที่ระยะเวลา 12 วัน และเมื่อนำสายพันธุ์ที่ 5 มาย้อมแกรมพบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม เซลล์ต่อกันเป็นสาย

ธนาสิน ธนอนันต์โชค
.....
ลายมือชื่อนักศึกษา

.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

สุภาพรรณ โรจน์อัมพร
.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

.....
วัน เดือน ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้เนื่องจากความกรุณาจาก อาจารย์อัชชา วงศ์เจริญสถิตย์ ที่ได้ให้เกียรติเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาและ อาจารย์นิตยา พิระภัทรุ่งสุริยา ที่ให้เกียรติเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ซึ่งให้ความรู้และคำเสนอแนะอันมีค่าและเป็นประโยชน์ ตลอดจนช่วยตรวจทานและแก้ไขปัญหาพิเศษฉบับนี้จนสมบูรณ์ คณะผู้จัดทำรู้สึกซาบซึ้งและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ประมวล ศรีกาหลง ที่ได้ให้เกียรติเป็นคณะกรรมการในการสอบปัญหาพิเศษและ ดร.บุญเทียม พันธุ์เพ็ง ที่ให้ความรู้และคำเสนอแนะอันเป็นประโยชน์ในการทำปัญหาพิเศษฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร ที่กรุณาช่วยเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะส่วนต้นของวัวและให้ความรู้รวมทั้งข้อเสนอแนะต่างๆ ซึ่งเป็นประโยชน์ในการทำปัญหาพิเศษ

ขอขอบคุณ คุณสุธีรวัฒน์ พันธุ์มาลัย ที่กรุณาเสียสละเวลาในการช่วยเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะส่วนต้นของวัว รวมทั้งให้ความรู้และข้อเสนอแนะต่างๆ อันเป็นประโยชน์ตลอดจนให้ใช้คอมพิวเตอร์ในการทำ power point เพื่อนำเสนอปัญหาพิเศษฉบับนี้

ขอขอบคุณ คุณเกรียงไกร พรมมา ที่ให้คำแนะนำรวมทั้งความรู้ และเป็นกำลังใจให้ตลอดมา

ขอขอบคุณ บรรณารักษ์ของห้องสมุดทุกๆ ท่าน ที่คอยอำนวยความสะดวกและให้ความช่วยเหลือในการค้นคว้าข้อมูลเพื่อประกอบการทำปัญหาพิเศษ

ขอขอบคุณสำหรับความช่วยเหลือ และกำลังใจ จากเพื่อนๆ น้องๆ ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตรทุกๆ คน

ท้ายสุดนี้ ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา พี่ๆ น้องๆ และสมาชิกในครอบครัวทุกคนที่ให้การสนับสนุน และเป็นกำลังใจ ทำให้การทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้สามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ธนาสิน ธนอนันต์โชค
สุภพรรณ โรจน์อัมพร

11 เมษายน 2543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบาญ	ค
สารบาญตาราง	ง
สารบาญภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	2
1. อาหารหยาบและผลพลอยได้จากการเกษตร	2
1.1 องค์ประกอบและลักษณะของเยื่อใย	2
1.2 องค์ประกอบทางเคมีของเยื่อใย	3
2. เซลลูโลส	6
2.1 ลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลส	7
2.2 การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส	10
3. เอนไซม์เซลลูเลส	10
3.1 ระบบเอนไซม์เซลลูเลส	10
3.2 สมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส	11
3.3 จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส	11
4. กระเพาะส่วนต้นของวัว	13
4.1 ตำแหน่ง (สรีระของวัว)	13
4.2 การเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมน	13
4.3 ระบบนิเวศน์วิทยาของจุลินทรีย์ในกระเพาะส่วนต้น	16
4.4 จุลินทรีย์ในกระเพาะส่วนต้น	17
5. การแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสจากธรรมชาติ	23
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	26
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	30
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	41
เอกสารอ้างอิง	43
ภาคผนวก ก	45
ภาคผนวก ข	50
ประวัติผู้เขียน	53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบาญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณของผลพลอยได้จากการเกษตรในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และเอเชียใต้	2
2	ส่วนประกอบทางเคมีของผลพลอยได้เยื่อใยการเกษตร	5
3	ส่วนประกอบเซลล์ของผลพลอยได้จากการเกษตรบางชนิด	6
4	จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้	12
5	Rumen Bacteria ที่ทำหน้าที่ย่อย Cell Wall Polysaccharides	19
6	การกระจายตัวของ Bacteria ที่เกาะยึดกับผนังเซลล์หรือปะปนอยู่ใน Rumen Fluid	20
7	จำนวน Bacteria ที่นับได้ *Lactobacilli* และ *Streptococci* (x 10^8/ml) ใน Rumen ของวัวที่ได้รับเมล็ดธัญพืช, หญ้าแห้งหรือกากน้ำตาล	21
8	การจำแนกชนิดของ Protozoa ในกระเพาะ Rumen	22
9	ผลการคัดแยกเชื้อ Bacteria ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งแยกได้จากกระเพาะส่วนต้นของวัวบนอาหารแข็งสูตร Rumen Fluid Cellulose Agar (RFCA) ที่อุณหภูมิ 37-39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์	35
10	ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของ Bacteria ที่คัดเลือกได้จากกระเพาะส่วนต้นของวัว โดยใช้เทคนิค Point Inoculation บนอาหารแข็งสูตร Rumen Fluid Cellulose Agar (RFCA)	38
11	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างจากเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกโดยวิเคราะห์หา CMCase	39
12	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ของสารละลายน้ำตาลกลูโคส	50
13	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 2 ที่คัดเลือกได้จากกระเพาะส่วนต้นของวัว	51
14	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 5 ที่คัดเลือกได้จากกระเพาะส่วนต้นของวัว	52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบาญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	สูตรโมเลกุลและลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลส	8
2	โครงสร้างเซลลูโลสที่พบในผนังเซลล์พืชทั่วไป	9
3	ลักษณะรูปร่างของระบบทางเดินอาหาร	14
4	ตำแหน่งที่อยู่กระเพาะของวัวโดยภาพจากด้านซ้ายของลำตัว	14
5	ลักษณะแคนนูลา (cannula) บริเวณลำตัววัว	15
6	วิธีการเก็บตัวอย่างจากกระเพาะส่วนต้นของวัว	31
7	ตัวอย่างของเหลว (Rumen Fluid) จากกระเพาะส่วนต้นของวัว	32
8	การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในจานอาหารวุ้นแข็งสูตร Rumen Fluid Cellulose Agar (RFCA) ที่บ่มในตู้บ่มไร้อากาศเป็นเวลา 3 สัปดาห์	33
9	ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ที่มีบริเวณใส บนอาหารแข็งสูตร Rumen Fluid Cellulose Agar (RFCA) ที่บ่มในตู้บ่มไร้อากาศเป็นเวลา 3 สัปดาห์	34
10	ลักษณะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารวุ้นแข็งสูตร Rumen Fluid Cellulose Agar (RFCA) ที่บ่มในตู้บ่มไร้อากาศเป็นเวลา 3 สัปดาห์	36
11	เชื้อแบคทีเรียที่เก็บไว้ในหลอดอาหาร Cellulose Broth (CB) เททับด้วยพาราฟินเหลวแล้วนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	36
12	กราฟแสดงกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกโดยวิเคราะห์หา CMCase	40
13	กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ของสารละลายน้ำตาลกลูโคส	50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

ในระบบการย่อยอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง จุลินทรีย์เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายเซลลูโลส ซึ่งจุลินทรีย์ในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้องถูกควบคุมอยู่ภายใต้ความสมดุลของระบบนิเวศน์ในสภาวะไร้ก๊าซออกซิเจน (anaerobic condition) ที่อุณหภูมิประมาณ 39-40 องศาเซลเซียส มีความเป็นกรดและเป็นด่างประมาณ 6-7 โดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่คือ แบคทีเรีย รองลงมาคือโปรโตซัว และเชื้อรา ตามลำดับ ซึ่งแบคทีเรียในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้องนั้น นักวิทยาศาสตร์เชื่อว่า แบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่มีความสำคัญมาก โดยเฉพาะกลุ่มของแบคทีเรียที่เข้าย่อยสลายเยื่อใยก่อนที่จุลินทรีย์กลุ่มอื่นจะเข้าย่อยสลายอาหารต่อไป (Hungate, 1950)

เนื่องจากเซลลูโลสมีลักษณะโครงสร้างทางเคมีเป็นสายยาว จุลินทรีย์ไม่สามารถนำเข้าสู่เซลล์โดยตรง ดังนั้นจุลินทรีย์ต้องสร้าง extracellular enzyme ออกมาย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นสารประกอบอินทรีย์ละลายน้ำได้ และสามารถผ่านเข้าไปภายในเซลล์ได้ เอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้เรียกว่า เอนไซม์เซลลูเลส มีสิ่งมีชีวิตหลายชนิดสร้างเอนไซม์นี้ได้ (พรทิพย์, 2528)

ในธรรมชาติมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสออกมาย่อยเซลลูโลส เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย และเชื้อแอคติโนมัยซิติส ผลจากการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือ น้ำตาลกลูโคส ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการผลิตแอลกอฮอล์ โปรตีนเซลล์เดียว ไวตามิน กรดอินทรีย์ สารปฏิชีวนะ และเคมีภัณฑ์ต่างๆ โดยผ่านกระบวนการหมัก นอกจากนี้ยังมีการนำเอนไซม์เซลลูเลสไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ อีก เช่น อุตสาหกรรมการผลิตยาง อาหาร กระดาษ เป็นต้น (พรเทพ, 2538)

ถึงแม้การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยระบบของเอนไซม์จะประสบผลสำเร็จมาก แต่จากการวิเคราะห์ทางด้านเศรษฐกิจพบว่า ต้นทุนในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสยังคงสูงอยู่ ด้วยเหตุนี้งานวิจัยส่วนใหญ่จึงพยายามศึกษาค้นคว้า เพื่อที่จะปรับปรุงผลิตภัณฑ์ของเอนไซม์ให้ต่ำลง ซึ่งอาจทำได้โดยการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงในธรรมชาติ โดยวิธีนี้เป็นขั้นตอนแรกในการพบสายพันธุ์ใหม่ๆ ของเชื้อจุลินทรีย์ (พรเทพ, 2538)

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการศึกษาการแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสในกระเพาะส่วนต้นของวัว โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีองค์ประกอบของเซลลูโลส เพื่อเป็นแนวทางหนึ่งในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส และนำไปใช้ในการเพิ่มคุณค่าของวัตถุดิบเหลือทิ้งจากการเกษตรต่อไป โดยมีวัตถุประสงค์ของการทดลอง ดังนี้

เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสจากกระเพาะส่วนต้นของวัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

1. อาหารหยาบและผลพลอยได้จากการเกษตร

อาหารหยาบเป็นแหล่งอาหารที่จำเป็นและสำคัญของสัตว์เคี้ยวเอื้องในประเทศแถบเอเชียโดยเฉพาะพวกผลพลอยได้จากการเกษตร จะพบว่ามีอยู่ในปริมาณมาก ผลพลอยได้จากการเกษตรที่มีอยู่เป็นจำนวนมาก ได้แก่ ฟางข้าว ชานอ้อย ยอดอ้อย แกลบ ต้นข้าวโพด ต้นข้าวฟ่าง กากสับปะรด ใบมันสำปะหลัง เถามัน เยื่อใยจากปาล์มน้ำมัน ฯลฯ ในจำนวนนี้จะเห็นว่าฟางข้าวมีเป็นจำนวนมากที่สุด ซึ่งเกษตรกรในแถบเอเชียใช้เป็นอาหารหลักเพื่อเลี้ยงโค-กระบือในช่วงเวลาที่ขาดแคลนหญ้าสด (เมธา, 2533)

ตารางที่ 1 ปริมาณของผลพลอยได้จากการเกษตรในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และเอเชียใต้
(x พันตัน)

ชนิด	เอเชียตะวันออกเฉียงใต้	เอเชียใต้	รวม
แกลบ	11,865	17,000	28,865
ฟางข้าว	74,162	114,500	188,662
ต้นข้าวโพด	7,100	15,500	22,600
ต้นข้าวฟ่าง	2,142	33,500	35,042
ต้นและใบมันสำปะหลัง	155	-	-
ชานอ้อย	8,126	6,264	14,390
ยอดอ้อย	10,535	8,600	19,135
เถาถั่วลิสง	844	-	-
เยื่อใยจากปาล์มน้ำมัน	10,535	-	-
กากสับปะรด (แห้ง)	854	-	-
ฟางข้าวสาลีและข้าวบาร์เลย์	-	67,000	67,000

ที่มา : เมธา, 2533

1.1 องค์ประกอบและลักษณะของเยื่อใย

ปริมาณเยื่อใย (fiber) ในวัตถุดิบอาหารสัตว์ โดยทั่วไปจะเป็นตัวลดทั้งคุณค่าทางอาหารและทางเศรษฐศาสตร์ แต่ในโคนมอาหารเยื่อใยมีความจำเป็นในการช่วยดำรงสภาพสมดุลภายในกระเพาะหมัก จำนวนอาหารเยื่อใยที่เพียงพอจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตการให้ผลผลิตและสุขภาพของวัว ดังนั้นปริมาณเยื่อใยมีความสำคัญไม่เฉพาะในวัวเท่านั้น แต่มีความสำคัญต่อโภชนาการของมวลมนุษย์ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุดิบอาหารสัตว์ที่เป็นผลพลอยได้จากการเกษตรทุกชนิด มีปริมาณของเยื่อใยทั้งนั้นจะแตกต่างกันเพียงปริมาณที่พบ เยื่อใยประกอบด้วยสารประกอบหลายชนิดและมีส่วนของคาร์โบไฮเดรตที่ซับซ้อน ซึ่งสามารถดูความแตกต่างลักษณะของเยื่อใยได้จากสายตา โดยทั่วไปพืชที่ใช้ทำอาหารสัตว์มีส่วนของลำต้นมากจะมีปริมาณของเยื่อใยเป็นองค์ประกอบมากเช่นกัน ถ้าดูในกล้องจุลทรรศน์จะเห็นว่าเยื่อใยคือส่วนของผนังเซลล์พืช (cell wall) ที่ทำหน้าที่ป้องกันเมล็ดที่อยู่ภายในเปลือกของเมล็ดพืช โดยเยื่อใยจะช่วยป้องกันส่วนของพืชไม่ให้ถูกทำลายจากสภาพแวดล้อมได้ง่าย รวมทั้งการย่อยสลายจากจุลินทรีย์ต่างๆ ด้วยเหตุนี้จึงต้องมีการศึกษาองค์ประกอบและลักษณะของเยื่อใย โดยจะพบว่าความแตกต่างของเยื่อใยพืชนั้นจะขึ้นอยู่กับชนิดของพืชรวมทั้งอายุของพืชนั่นเอง (เมธา, 2533)

1.2 องค์ประกอบทางเคมีของเยื่อใย (เมธา, 2533)

องค์ประกอบที่เป็นเยื่อใย ก็คือคาร์โบไฮเดรตที่ซับซ้อนและส่วนที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรต เช่น ลิกนิน (lignin), silica, cutin เป็นต้น

Cellulose คือคาร์โบไฮเดรตชนิดที่พบมากที่สุดในเยื่อใยพืช จัดเป็น polysaccharide ที่จะให้ glucose ต่างกับแป้ง (starches) ที่ไม่ใช่ fiber แต่ให้ glucose เป็นจำนวนมากเช่นกัน แต่จะต่างกันที่พันธะที่ใช้ในการเกาะเกี่ยว แป้งจะมีพันธะเป็น α-linkage และ cellulose จะมีพันธะ β-linkage β-linkage จะมีความสำคัญ 1) เป็นพันธะที่มีความแข็งแรงมาก เช่น ใยฝ้าย 2) ระบบการย่อยอาหารของสัตว์จะไม่มีเอนไซม์ที่ย่อย β-linkage cellulose จึงต้องได้รับการย่อยสลายจากจุลินทรีย์ที่อยู่ในกระเพาะหมักของโค แต่ในสัตว์กระเพาะเดี่ยวจะย่อยไม่ได้ ยกเว้นการย่อยแป้งให้เป็น glucose จากพันธะ α-linkage นั่นเอง

Hemicellulose คือคาร์โบไฮเดรตที่มากรองจาก cellulose และมีลักษณะคล้ายกัน ยกเว้นสลายตัวในสารเคมีได้ง่ายกว่า จึงย่อยได้ง่ายกว่า cellulose hemicellulose เป็น polysaccharides ที่อยู่ในรูป simple sugars (มี 5 คาร์บอนและ uronic acids)

Pentosans จะต่างจาก cellulose ที่ประกอบด้วยลูกโซ่ของน้ำตาล 5 คาร์บอน (glucose = 6-carbon sugar) pentosan จะพบปริมาณ 20% ของคาร์โบไฮเดรตใน hay และจะพบมากในซังข้าวโพดกับเปลือก

Pectin, gums และ mucilages บางที่อาจรวมอยู่กับ hemicellulose แต่มีองค์ประกอบเป็น galacturonic acid pectin จะย่อยได้ง่าย เช่น กากส้ม จะมี pectin อยู่มาก

Lignin เป็นส่วนคาร์โบไฮเดรตที่แข็งแรงมากที่สุดของพืช เราสามารถเทียบความแตกต่างจาก cellulose เช่น ในใยฝ้ายจะมีแต่ cellulose จะมีความเหนียวยืดหยุ่นแต่ในเนื้อไม้เปลือกไม้จะมี lignin มาก จะแข็งแรงแต่หักได้ง่าย lignin มีคุณค่าทางอาหารสำหรับโคนมต่ำสุด โคนมจะย่อย lignin ไม่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และอาหารที่มี lignin ประกอบอยู่มาก จะย่อยยากด้วยประสิทธิภาพในการย่อยได้ลดลง เช่น ในพืชอาหารสัตว์ที่แก่จัดจะมี lignin ประกอบอยู่มากตามอายุของพืช

Silica เป็นส่วนแร่ธาตุของพืช และแร่ธาตุของสัตว์ แต่ silica มีคุณสมบัติ เช่น lignin คือ ย่อยได้ยาก silica จะมีมากน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของพืช พืชที่มี silica มาก จะทำให้การย่อยได้ต่ำ

Cutins จะเป็นส่วนประกอบที่มีมากในเปลือกเมล็ดธัญพืชต่างๆ เช่น เปลือกถั่ว ส่วนต้น และใบ พืชจะมี cutins เคลือบอยู่ cutins มีโครงสร้างที่ซับซ้อนประกอบด้วย fatty acid, alcohols, aldehydes, ketone และ paraffin hydrocarbons ซึ่งก็มีความทนทานต่อการย่อยในกระเพาะหมักเช่นเดียวกับ lignin

จากการวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมีและการทดลองในสัตว์ (บางส่วน) ดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3 พบว่า ผลพลอยได้จากการเกษตรเหล่านี้หลายชนิดมีคุณค่าทางโภชนะสูง ควรนำมาเป็นอาหารเลี้ยงสัตว์เคี้ยวเอื้องได้เลย โดยปราศจากการปรับปรุง แต่ผลพลอยได้บางอย่าง เช่น ชานอ้อย ฟางข้าว เป็นต้น การปรับปรุงโดยกรรมวิธีต่างๆ อาจจะทำให้การใช้ประโยชน์มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แสดงถึงส่วนประกอบทางเคมีของผลพลอยได้เยื่อใยการเกษตร

Matter	Percentage of dry matter								
	Dry matter	Ash protein	Crude protein	ADF walls	Cell wall	Cellulose cellulose	Hemi-cellulose	Lignin fibre	Crude protein
Cereal straws									
Barley	89.4	6.4	2	53.6	77.3	40.7	23.8	8.0	41.6
Oat	89.2	4.4	4.1	57.1	82.3	44.0	5.2	11.2	41.0
Rice	95.0	19.4	3.2	45.9	80.7	39.6	34.3	6.3	35.1
Sorghum	93.5	6.0	3.4	49.4	81.4	42.2	31.6	7.6	41.8
Triticale	-	5.6	2.9	58.6	80.6	44.9	2.0	9.7	-
Wheat	91.0	6.4	2.6	57.5	80.2	43.2	22.4	9.5	43.6
Legume straws									
Cowpea	83.0	11.2	17.1	40.8	54.0	27.2	13.2	14.2	48.0
Lupin	84.9	2.7	3.6	68.6	82.0	53.2	13.4	15.3	53.1
Soybean	91.0	5.1	5.1	-	71.7	-	-	-	44.3
Tropical byprcducts									
Sugarcane bagasse	91.5	3.1	1.7	49.2	83.4	38.4	34.2	10.8	48.6
Sugarcane tops	29.6	9.5	5.1	38.2	67.0	25.7	25.7	7.5	35.8
Sisal bagasse	12.9	-	7.5	-	-	-	-	-	30.7
Sisal pulp	18.5	-	5.5	30.7	33.0	-	-	4.6	26.1
Banana leaves	-	-	14.9	30.5	61.1	-	-	7.6	-
Banana stalk	-	-	11.9	21.0	41.0	-	-	6.1	-
Fruit and vagetable residues									
Cetrus pulp, dried	89.2	7.8	7.1	20.5	22.6	-	-	2.6	12.9
Pineapple cannery waste	90.0	4.0	6.9	37.0	73.1	-	-	7.1	19.6
Livestock manures									
Beef cattle	-	19.8	25.0	26.1	31.7	-	-	5.0	28.4
Poultry broiler litter, dried	83.3	12.8	28.4	37.3	-	-	-	-	16.8
Poultry broiler litter, ensiled	61.3	12.9	31.7	37.0	-	-	-	-	-
Poultry menure, layer	89.7	28.0	23.4	15.2	37.7	-	-	1.4	12.7
Cereal byproducts									
Oat hulls	91.0	5.7	3.1	36.1	76.4	26.8	31.4	2.8	29.5
Rice hulls	90.3	1.6	2.2	67.6	78.0	42.2	-	10.4	44.4
Rice bran	-	-	7.9	28.4	30.4	-	-	4.0	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Matter	Percentage of dry matter								
	Dry matter	Ash protein	Crude protein	ADF walls	Cell wall	Cellulose cellulose	Hemi-cellulose	Lignin fibre	Crude protein
Oilseed hulls									
Peanut	82.3	7.4	8.4	65.4	74.4	48.5	-	18.0	65.4
Soybean	92.2	4.6	11.9	51.1	62.6	52.1	-	2.0	36.1
Sunflower	92.8	2.5	7.0	58.8	-	-	-	22.4	24.7
Other hulls									
Cottonseed	89.9	2.4	3.4	65.3	86.8	-	-	23.0	47.9
Lupin	88.4	2.7	9.5	-	-	-	-	-	46.8

ที่มา : เมธา, 2533

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบเซลล์ของผลพลอยได้จากการเกษตรบางชนิด

ชนิด	%					
	Cell content	Cell wall	Cellulose	Hemicellu-lose	Lignin	Silica
ฟางข้าว	21	79	33	26	7	13
ฟางข้าวบาร์เลย์	19	81	44	27	7	3
ฟางข้าวสาลี	20	80	39	39	10	6
ฟางข้าวโอ๊ต	27	73	41	16	11	3
ตอซังข้าวฟาง	26	74	31	30	11	3
ชานอ้อย	18	82	40	29	13	2

ที่มา : เมธา, 2533

2. เซลลูโลส

เซลลูโลส (Cellulose) เป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่ง โครงสร้างประกอบด้วยหน่วยย่อยของกลูโลส 8,000-12,000 หน่วยเชื่อมต่อกัน แหล่งที่สำคัญของเซลลูโลสนอกจากจะได้มาจากพืชตามธรรมชาติแล้ว ยังได้จากอุตสาหกรรมการแปรรูปพืช และอุตสาหกรรมอื่นๆ อีก เช่น อุตสาหกรรมแปรรูปไม้ อุตสาหกรรมเส้นใย อุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ ขยะเทศบาล รวมไปถึงวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ประเภทลิกโนเซลลูโลส (lignocellose) ซึ่งวัสดุเหล่านี้ประกอบไปด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในอัตราส่วน 4 : 3 : 2 โดยประมาณตามลำดับ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ชนิดของเนื้อเยื่อ อายุ สภาพแวดล้อมของการเจริญเติบโต สภาพทางสรีระวิทยา และวิธีการวิเคราะห์ (พรเทพ, 2538)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1 ลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลส

เซลลูโลสเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดโพลีแซคคาไรด์ ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยของดีกลูโคส (D-glucose) ในรูปบีตา-ดี-กลูโคไพราโนส (β-D-glucopyranose) มาเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic linkage) ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 1 กับคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 4 ในโมเลกุลถัดไป (ภาพที่ 1ก) หนึ่งโมเลกุลของเซลลูโลสประกอบด้วยดี-กลูโคสประมาณ 15 หน่วย จนถึงประมาณ 14,000 หน่วย (พรเทพ, 2538) มีค่าน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1.5 เมกกะดาลตัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช น้ำหนักโมเลกุลของกลูโคส เท่ากับ 180.16 ดาลตัน ความยาวของหน่วยย่อยดี-กลูโคส เท่ากับ 0.515 นาโนเมตร และความยาวทั้งหมดของโมเกุลเซลลูโลสมีค่ามากกว่า 5 ไมโครเมตร ถ้าพิจารณาถึงโครงรูป (conformation) ของการจัดเรียงตัวของหน่วยย่อยดี-กลูโคส จะอยู่ในลักษณะ chair form แต่ละโมเลกุลในสายเซลลูโลสจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 3 กับออกซิเจนที่อยู่ในวงแหวนของโมเลกุลถัดไป และเชื่อมต่อระหว่างสายเซลลูโลสที่ขนานกัน ด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 กับออกซิเจนที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลของดี-กลูโคสในอีกสายหนึ่ง (Nisizawa, 1972) (ภาพที่ 1ข) การจัดเรียงตัวเหล่านี้ ทำให้สายเซลลูโลสเรียงตัวขนานซึ่งกันและกันอย่างมีระเบียบเป็นกลุ่มเป็นผลึก (crystalline micelles) โดยแต่ละกลุ่ม ประกอบด้วยโมเลกุลเซลลูโลสประมาณ 100 โมเลกุล มีรูปร่างเป็นแถบหนา กลุ่มเหล่านี้ประมาณ 10 ถึง 20 กลุ่ม จะมาเรียงตัวเป็นโครงสร้างที่ใหญ่ขึ้นเรียกว่า ไมโครไฟบริล (microfibril) ซึ่งสามารถแบ่งลักษณะโครงสร้างเซลลูโลสในผนังเซลล์พืช ตามการจัดเรียงตัวของไมโครไฟบริลได้ 3 ลักษณะ (Nisizawa, 1973) คือ

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

ข. โครงสร้างเซลลูโลสที่ม้วนหรือพับตามแกนของเส้นใยเซลลูโลส (ภาพที่ 2ข)

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

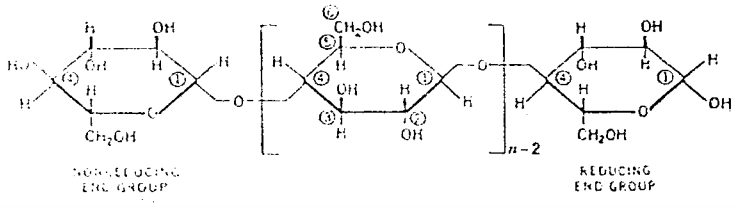
เซลลูโลสไม่ละลายในน้ำ ตัวทำลายอินทรีย์ หรือสารละลายด่างอ่อน แต่ละลายได้ดีในกรดหรือด่างแก่ ดังนั้นจึงสามารถแบ่งชนิดของเซลลูโลสตามลักษณะการละลายในกรด หรือด่างได้ 3 ชนิด คือ

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

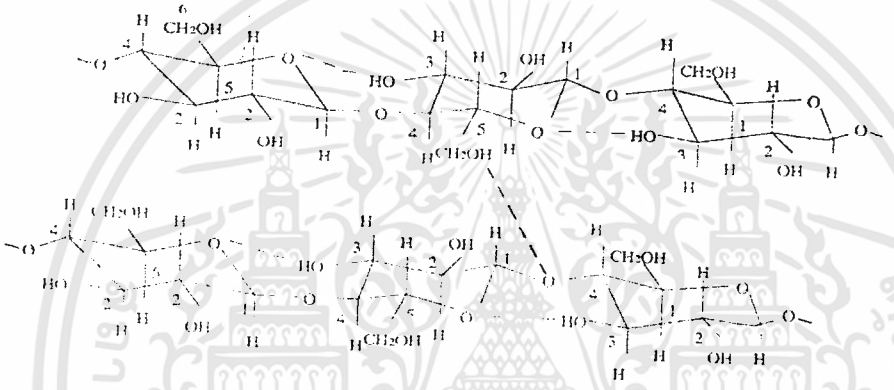
ข. บีตา-เซลลูโลส (β-cellulose) เป็นเซลลูโลสที่สามารถละลายโซเดียมไฮดรอกไซม์ 17.5 เปอร์เซ็นต์

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก



ข

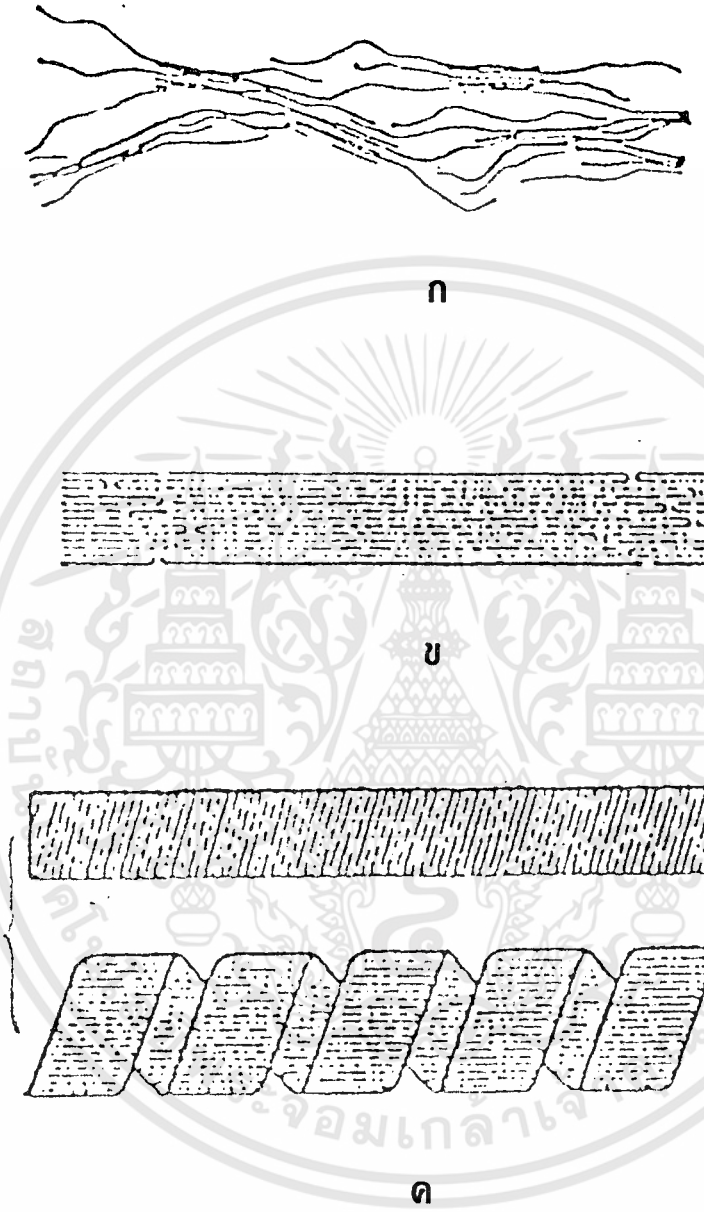
ภาพที่ 1 แสดงสูตรโมเลกุลและลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลส

ก. สูตรโมเลกุล

ข. ลักษณะโครงสร้าง

ที่มา : Nisizawa (1973)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2 โครงสร้างเซลลูโลสที่พบในผนังเซลล์พืชทั่วไป

ก. Fringe micelles ในไมโครไฟบริล

ข. โครงสร้างเซลลูโลสที่ม้วนหรือพับไปตามแกนของเส้นใยเซลลูโลส

ค. โครงสร้างเซลลูโลสที่มีลักษณะเป็นริบบินหนา

ที่มา : Nisizawa (1973)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส (พรเทพ, 2538)

ในธรรมชาติการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส เกิดโดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์หลายชนิดร่วมกัน ในสภาพที่มีออกซิเจน ผลที่ได้จากการย่อยสลาย จะได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ฮิวมัส ความร้อน และจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น โดยที่ปริมาณการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์จะได้มาจากการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสในสภาพที่เหมาะสม มีการระบายอากาศ และอุณหภูมิที่เหมาะสม มีแหล่งอาหารเพียงพอกับการนำไปสร้างพลังงานเพื่อใช้ในระบบเมตาบอลิซึม และการเพิ่มจำนวนเซลล์ ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน การย่อยสลายเซลลูโลส จะได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรเจน เอทธานอล กรดฟอร์มิก กรดซัคซินิก กรดบิวทีริก และกรดแลกติก เป็นต้น นอกจากนี้การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส ยังสามารถทำได้โดยวิธีทางเคมี ซึ่งเป็นการย่อยสลายด้วยสารเคมี อาทิเช่น การใช้กรด การย่อยสลายวิธีนี้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะไม่เฉพาะเจาะจง ดังนั้นน้ำตาลกลูโคสบางส่วนที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับกรดต่อไป ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงชนิดอื่น และกรดยังทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ติดมากับเซลลูโลส ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ นอกจากนี้โครงสร้างในส่วนที่เป็น คริสตัลลีน ก็จำเป็นต้องใช้กรดที่มีความเข้มข้น และอุณหภูมิสูงในการย่อยสลายจึงจะได้น้ำตาลกลูโคส ปฏิกิริยาย่อยจึงเกิดแบบรุนแรง ภาชนะที่ใช้ต้องทนทานต่อการกัดกร่อน ต้นทุนจึงสูง และกรดที่ถูกทิ้งออกมายังก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย แต่วิธีนี้ปฏิกิริยาการย่อยสลายจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายภายใน 15-20 นาที หรือโดยวิธีทางชีวภาพ อาทิเช่น การย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส วิธีเป็นวิธีที่มีความเฉพาะเจาะจงระหว่างเอนไซม์เซลลูเลสกับสารประกอบเซลลูโลส โดยจะไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ปนมา จึงทำให้ได้น้ำตาลกลูโคสซึ่งค่อนข้างบริสุทธิ์ ลักษณะการย่อยจะเกิดขึ้นช้าๆ ปฏิกิริยาเกิดขึ้นในที่มีอุณหภูมิซึ่งสิ่งมีชีวิตสามารถเจริญเติบโตได้ และปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นก็ไม่รุนแรง นอกจากนี้ก็ไม่อาจจำเป็นต้องใช้ภาชนะที่ทนทานต่อการกัดกร่อน ต้นทุนจึงต่ำกว่า และยังไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม หากแต่วิธีนี้น้ำตาลกลูโคสที่ได้อยู่ในรูปสารละลายเจือจาง

3. เอนไซม์เซลลูเลส

3.1 ระบบเอนไซม์เซลลูเลส

จากการศึกษาโดยการแยก และทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ เพื่อศึกษาระบบของเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าเซลลูเลสเป็น multicomponent enzymes มีระบบเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิด มาทำงานร่วมกัน (พรเทพ, 2538) คือ

ก. Exo β-1, 4-glucan cellobiohydrolase หรือ Exoglucanse หรือ C_1 (EC.3.2.1.91)

ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสโดยตัดพันธะของ β-1, 4-glucosidic จากปลายด้านของ non-reducing ทำให้ได้เซลโลไบโอส และกลูโคส (ในปริมาณที่น้อย) น้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายจะมีการจัดเรียงเป็นตัว α-configulation (inversion)

ข. Endo β-1, 4-glucan glucanohydrolase หรือ Endoglucanse หรือ C_x (EC.3.2.1.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลส โดยตัดพันธะ β-1, 4-glucosidic ภายในเซลลูโลส ในบริเวณที่เป็นอะมอร์ฟัส หรืออนุพันธ์ของเซลลูโลส เช่น carboxymethyl cellulose (CMC.) และ cello-oilgomers เอนไซม์นี้จะตัดพันธะอย่างสุ่ม ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์หลายชนิด คือ กลูโคส และเซลโลไบโอส โดยจะได้เซลโลไบโอสเป็นผลิตภัณฑ์หลัก

ค. β-1, 4-glucosidase หรือ cellobiase (EC.3.2.1.21)

ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสให้เป็นกลูโคส

การทำงานของ C_1 และ C_x เป็นปฏิกิริยาภายนอกเซลล์ ส่วนการทำงานของเอนไซม์ β-1, 4-glucosidase เป็นปฏิกิริยาภายในเซลล์ ส่วนอัตราการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลส ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น โครงสร้างธรรมชาติของเซลลูโลส องค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสที่เข้าทำปฏิกิริยา เป็นต้น (พรเทพ, 2538)

3.2 สมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส (พรเทพ, 2538)

จากการศึกษาถึงโครงสร้างของเอนไซม์เซลลูเลสพบว่า เซลลูเลสเป็น glycoprotein ประกอบด้วยโปรตีน และคาร์โบไฮเดรตในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000 ถึง 60,000 ดาลตัน มีสมบัติละลายน้ำได้ดี ไม่ต้องการ co-factor หรือโลหะอื่นๆ ในการทำปฏิกิริยา โดยทั่วไปเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากจุลินทรีย์ จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานประมาณ 50 องศาเซลเซียส ยกเว้นจุลินทรีย์ทนร้อนบางชนิด นอกจากนี้เอนไซม์เซลลูเลสยังมีความทนต่ออุณหภูมิสูง ทนต่อความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ในช่วงกว้างประมาณ 4.8 ถึง 8.0 และคงทนต่อสารเคมีได้ดี สามารถเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 และ 4.0 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลาหลายปี หรือเก็บโดยวิธี freeze dry หรือตกตะกอน ด้วยอะซิโตน หรือเอทธานอล โดยไม่สูญเสียสมบัติ อย่างไรก็ตามเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน ย่อมมีสมบัติแตกต่างกัน

3.3 จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส

เนื่องจากเซลลูโลสมีลักษณะโครงสร้างทางเคมีเป็นสายยาว จุลินทรีย์ไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้โดยตรง ดังนั้นจุลินทรีย์ต้องสร้าง extracellular enzymes ออกมาย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ และสามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ เอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้เรียกว่า เอนไซม์เซลลูเลส มีสิ่งมีชีวิตหลายชนิดสร้างเอนไซม์นี้ได้ (พรทิพย์, 2528)

จุลินทรีย์นับว่ามีความสำคัญในการย่อยสลายเซลลูโลสมาก จุลินทรีย์หลายชนิดที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อยสลายเซลลูโลสมักอยู่ในกลุ่มเชื้อรา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยสีท ดังตารางที่ 4 (พรเทพ, 2538)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้

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

ที่มา : พรเทพ, 2538

ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อจุลินทรีย์ ปัจจัยสำคัญที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ นอกจากจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์แล้ว ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ อีก เช่น ชนิดความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรอง รวมไปถึงสภาพแวดล้อมการผลิต ซึ่งได้แก่ อายุและปริมาณของเชื้อเริ่มต้น ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) อุณหภูมิ การให้อากาศ และอัตราการเขย่า (พรเทพ, 2538)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. กระเพาะส่วนต้นของวัว (Rumen)

4.1 ตำแหน่ง (สรีระของวัว)

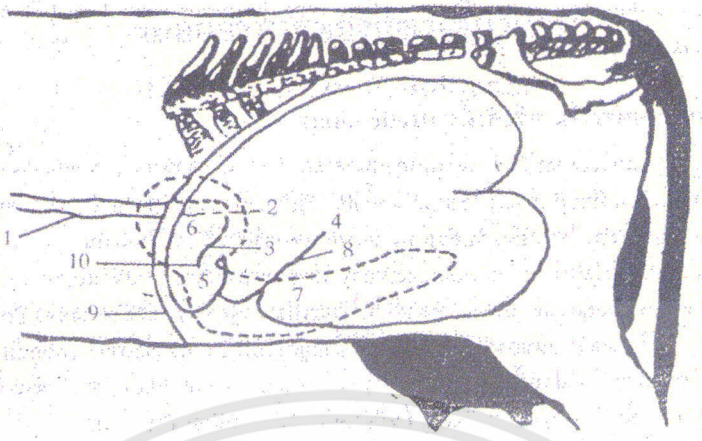
สัตว์เคี้ยวเอื้อง (Ruminant) มีความสามารถพิเศษในการใช้อาหารหยาบ (roughage) กระเพาะของสัตว์เหล่านี้มีลักษณะพิเศษสามารถจุได้ 20-40 แกลลอน ซึ่งขึ้นอยู่กับขนาดของสัตว์เอง กระเพาะทั้งหมดแบ่งออกเป็น 4 ส่วน คือ กระเพาะหมักหรือผ้าขี้ริ้ว (rumen) รังผึ้ง (reticulum) สามสิบกลีบ (omasum) และกระเพาะจริง (abomasum) สามส่วนแรกเป็น proventriculi ซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากการขยายตัวของหลอดอาหาร (exophagus) ส่วนของ reticulum และ rumen เชื่อมติดต่อกันด้วยผนังรอยต่อส่วน recticulum กับ rumen (rumino-reticular fold หรือ reticulo-rumen fold) อาหารในรูปของของแข็งและของเหลว จากนั้นสองส่วนจะเคลื่อนเข้าหากันได้อย่างอิสระ ในบริเวณส่วนเหล่านี้โดยเฉพาะในรูเมนจะมีประชากรจุลินทรีย์อยู่เป็นจำนวนมาก จุลินทรีย์จะทำหน้าที่ย่อยหมักอาหารที่สัตว์กินเข้าไป ซึ่งกระเพาะส่วนนี้มีความจุประมาณ 80% ของความจุกระเพาะทั้งหมด เป็นที่พักและหมักอาหารจำพวกที่มี fibre สูง เช่น หญ้า ฟางข้าว ฯลฯ rumen จะอยู่ติดกับผนังด้านซ้ายของช่องท้อง ตัวกระเพาะแบ่งออกเป็นหลายตอน โดยผิวด้านนอกของ rumen ถูกแบ่งโดยร่องลึก (deep groove) ออกเป็นส่วนที่เห็นได้ชัด คือ ส่วนบน (dorsal region) และส่วนล่าง (ventral region) นอกจากนี้ยังมีร่องที่แบ่งผนังด้านนอกออกเป็นส่วนหน้า (anterior) ส่วนกลาง (middle) และส่วนหลัง (posterior) ส่วนต่างๆ เหล่านี้ทำหน้าที่บีบและขยายตัวทำให้เกิดการไหลเวียนของอาหารที่อยู่ในกระเพาะ คลุกเคล้าอาหารเข้ากับ rumen fluid ผนังด้านในของ rumen จะประกอบด้วย papillae คือ ส่วนที่มีลักษณะคล้ายนิ้วยื่นออกมา (finger-like) จำนวนมาก อวัยวะส่วนนี้จะกระจายอยู่ทั่วไปภายใน rumen ทำหน้าที่เพิ่มเนื้อที่สัมผัสเพื่อการย่อย การคลุกเคล้าอาหาร การเคลื่อนบีบตัวของ rumen และการดูดซึมผ่านของ volatile fatty acids ผนังด้านในของ rumen จะถูกแบ่งออกเป็นส่วนต่างๆ โดย pillars ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ การแบ่งของ pillars จะตรงกับ deep groove ที่แบ่งลักษณะภายนอกออกจากกัน (ดังแสดงในภาพที่ 3 และภาพที่ 4) (วิศิษฐิพร, 2538)

4.2 การเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมน (พรรณทิพา, 2542)

ก่อนที่จะทำการเก็บตัวอย่างของเหลว (rumen fluid) จากกระเพาะส่วนต้นของวัวจะต้องทำการผ่าตัดใส่ cannula เพราะถ้าไม่ทำการผ่าตัดก่อนจะทำให้การเก็บตัวอย่างของเหลวทำได้ลำบาก ซึ่ง cannula เป็นวัสดุที่ทำมาจากยางซิลิโคน มีความอ่อนตัวไม่กดกระแทกแผลที่ทำการผ่าตัดมากนักเวลาที่สัตว์นอนหรือเสียดสีกับคอก ดังภาพที่ 5 ซึ่งการผ่าตัด cannula นั้นเป็นการผ่าตัดครั้งเดียว (one-step operation) โดยเปิดผ่าผิวหนังพร้อมกับกระเพาะรูเมนแล้วใส่ cannula ในครั้งเดียวกัน ซึ่งมีวิธีการคือ

นำสัตว์ที่ผ่านการคัดเลือกมาแล้วข้างต้น มาขังไว้ในคอกเดียวเพื่อทำการอดอาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และอดน้ำเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อให้อาหารเหลือตกค้างในกระเพาะน้อยที่สุดและทำให้เลือดออก

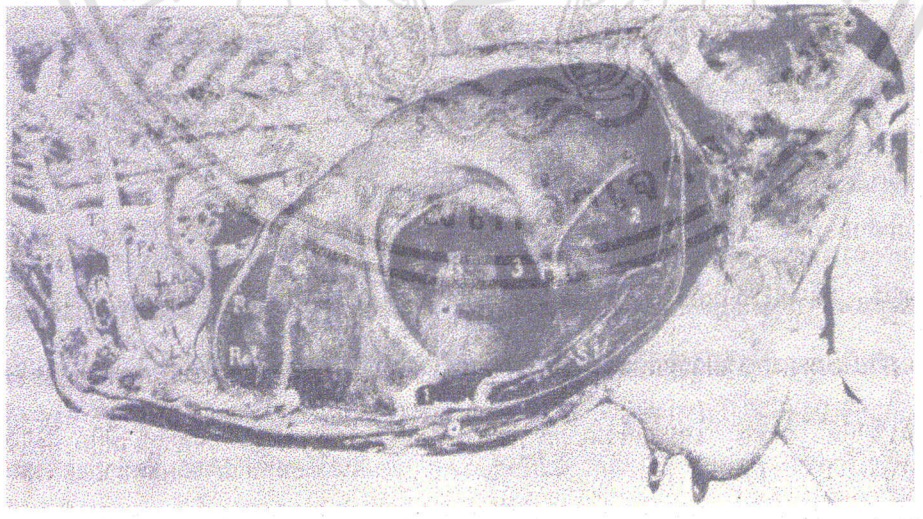
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



1. esophagus
2. cardia
3. esophageral groove
4. rumen
5. reticulum
6. omasum
7. abomasum
8. anterior pillar of rumen
9. diaphramg
10. reticulo omasal orifice

ภาพที่ 3 ลักษณะรูปร่างของระบบทางเดินอาหาร

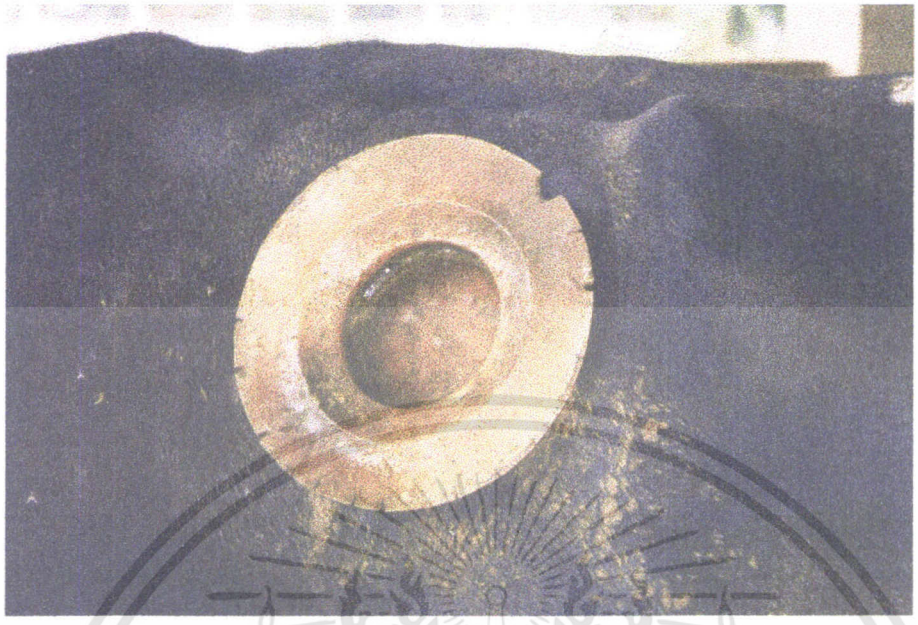
ที่มา : เมธา, 2533



ภาพที่ 4 ตำแหน่งที่อยู่กระเพาะของวัวโดยภาพจากด้านซ้ายของลำตัว

ที่มา : เมธา, 2533

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 5 ลักษณะแคนนูลา (cannula) บริเวณลำตัววัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้อยเวลาผ่าตัด ฉีด Rompun ขนาด 0.6 mg/kg เข้ากล้ามเนื้อบริเวณสะโพกเพื่อระงับความรู้สึก โดยค่อยๆ ฉีดครั้งละ 1 ซีซี แล้วจึงฉีด Xylocain บริเวณกระดูกสันหลัง 30 ซีซี ค่อยๆ ฉีด Rompun เป็นระยะๆ ครั้งละ 1 ซีซี เมื่อโคซึมและล้มลงนอน จัดให้โคนอนตะแคงโดยให้ส่วนกระเพาะ(สวาป)ด้านซ้ายอยู่ด้านบน แล้วจึงทำความสะอาดบริเวณที่จะเจาะกระเพาะ โดยการโกนขนออกแล้วทำความสะอาดด้วย Dettol การโกนขนจะเป็นสี่เหลี่ยมประมาณ 1 ตารางฟุต แล้วใช้กระดาษแข็งแผ่นวงกลมที่มีขนาดเท่าท่อด้านในของ cannula ทาบบริเวณสวาป ทำเครื่องหมายไว้โดยใช้มีดกรีดผ่าหนังให้เปิดออกเป็นวงกลมตามขนาดกระดาษแข็ง และผ่าหนังออกแล้วจึงใช้เข็มกับไหมละลายเย็บกล้ามเนื้อให้ติดกับเนื้อเยื่อใต้ผิวหนังแบบ simple continuous suture จากนั้นเปิดผ่ากระเพาะรูเมน ใช้ไหมเส้นดูให้ติดกับผิวหนังแบบ simple continuous suture แล้วล้างแผลด้วยน้ำเกลือและทาแผลด้วยทิงเจอร์ไอโอดีน จากนั้นสอด cannula (ที่ทำมาจากยางซิลิโคนซึ่งเป็นวัสดุที่มีความอ่อนตัวไม่กดกระแทกแผลที่ผ่าตัดมากนักเวลาที่สัตว์นอนหรือเสียดสีกับคอก) แล้วทาทิงเจอร์ซ้ำอีกครั้งและฉีด streptomycin เข้ากล้ามเนื้อ เพื่อกันการอับเสบ และฉีด Tetanus เพื่อกันบาดทะยัก ส่วนวันต่อมาฉีด Oxytetracyclin (L.A.) และล้างแผลด้วยน้ำเกลือและทาด้วยทิงเจอร์ไอโอดีนทุกวัน ประมาณ 2-3 อาทิตย์ (พรรณทิพา, 2542) เมื่อแผลของโคหายสนิทก็จะทำการเก็บตัวอย่างของเหลว (rumen fluid) จากกระเพาะส่วนต้นของวัว โดยเริ่มจาก

อุ่นกระติกน้ำร้อนเพื่อใส่ของเหลวจากกระเพาะรูเมน โดยใส่น้ำอุ่นประมาณ 60 องศาเซลเซียสไว้ในกระติก แล้วนำไปที่ฟาร์ม การเก็บของเหลวจากกระเพาะหมัก กระทำได้โดยการเปิดฝาที่กระเพาะหมักของโคก่อนให้อาหารเช้า ใช้มือสุ่มตัวอย่างหญ้าหมักแล้วนำมาบีบผ่านผ้ากรองประมาณ 4 ชั้น เพื่อให้มีสิ่งตกค้างน้อยที่สุดลงใน erlenmeyer flask แล้วถ่ายลงในกระติกน้ำร้อน ก่อนถ่ายตัวอย่างลงไปให้เทน้ำร้อนออกก่อน แล้วรีบนำกลับไปยังห้องปฏิบัติการ

4.3 ระบบนิเวศน์วิทยาของจุลินทรีย์ในกระเพาะส่วนต้น (Rumen microbial ecosystem)

(วิศิษฐิพร, 2538)

ระบบนิเวศน์วิทยาของจุลินทรีย์ภายในกระเพาะ rumen ค่อนข้างยุ่งยากซับซ้อน และมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา การเปลี่ยนแปลงนี้ส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับอาหารที่สัตว์กินเข้าไป สัตว์เคี้ยวเอื้องส่วนใหญ่จะกินอาหารประเภทที่มีคาร์โบไฮเดรต ซึ่งประกอบด้วย cellulose และ hemicellulose เป็นอาหารหลัก แต่ในบางโอกาสสัตว์อาจจะได้รับอาหารที่ประกอบด้วย soluble carbohydrates จำพวกเมล็ดธัญพืช หรือกากน้ำตาล

พืชที่สัตว์เคี้ยวเอื้องกินเป็นอาหารโดยทั่วไปจะมีการสร้างโครงสร้างโมเลกุลของผนังเซลล์ที่มีคุณสมบัติป้องกันการเข้าย่อยสลายของจุลินทรีย์ แต่ใน reticulo-rumen จะมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่มีความสามารถเข้าย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตในพืชนี้ได้ จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะเป็นพวก anaerobic bacteria, protozoa และ fungi anaerobic bacteria เป็นจุลินทรีย์หลักสำคัญในการทำให้เกิดการหมักของคาร์โบไฮเดรตที่อยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใน cell wall ของพืช ในขณะที่การค้นคว้าในปัจจุบันพบว่า anaerobic phycomycetous fungi เป็นตัวการสำคัญในการย่อยดังกล่าว เพราะ fungi นี้จะเป็นจุลินทรีย์ชนิดแรกที่เข้าย่อยสลาย cell wall ของพืช แล้ว bacteria จึงเข้าย่อยสลายแล้วเกิดการหมักในระยะต่อมา

จุลินทรีย์บางชนิดใน reticulo-rumen สามารถสังเคราะห์เอนไซม์เพื่อเข้าย่อยสลายเซลล์ของพืช ในขณะที่จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ จะย่อยสลายเฉพาะสารประกอบอย่างง่าย (simple compounds) เช่น cellobiose หรือ glucose

4.4 จุลินทรีย์ในกระเพาะส่วนต้น (Rumen Micro-organisms)

4.4.1 Bacteria (วิศิษฐ์พร, 2538)

Bacteria เป็นจุลินทรีย์ที่มีอยู่เป็นปริมาณมากที่สุดใน reticulo-rumen การจำแนกชนิดของ Bacteria สามารถจำแนกได้หลายแบบ เช่น จำแนกต่างส่วนต่างใน rumen ที่ bacteria ยึดเกาะอยู่ หรือจำแนกตามการใช้ประโยชน์อาหารหรือผลผลิตที่สังเคราะห์ได้

การจำแนก Bacteria ตามส่วนต่างๆ ที่ Bacteria เกาะอยู่

1) Bacteria ที่อยู่ใน Rumen Fluid (ประมาณ 30% ของ Bacteria ทั้งหมด)
2) Bacteria ที่เกาะอยู่กับอนุภาคอาหาร (ประมาณ 70% ของ Bacteria ทั้งหมด)
3) Bacteria ที่เกาะอยู่ตามเนื้อเยื่อของกระเพาะ Rumen
4) Bacteria ที่เกาะอยู่กับ Protozoa (ส่วนใหญ่จะเป็นพวก Methanogens)

ในขณะที่ Feed Particles ไหลผ่านออกจาก Rumen อย่างต่อเนื่อง Bacteria บางส่วนจะหลุดจากการเกาะยึด Feed Particles ที่ถูกย่อยแล้ว และเข้าทำการเกาะยึดกับ Particles ใหม่ ส่วนที่ยังยึดเกาะอยู่กับ Feed Particles จะไหลผ่านไปยัง Omasum และ Abomasum หลังจากนั้นจะถูก Enzymes ใน Abomasum ย่อยสลายได้สารอาหารที่สัตว์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ฉะนั้น Bacteria ที่หลุดจากการเกาะยึด Feed Particles และปะปนอยู่ใน Rumen Fluid จะเป็นตัวที่มีบทบาทสำคัญในการขยายพันธุ์และเข้าเกาะยึด Feed Particles ใหม่ เพื่อการย่อยต่อไป โดยทั่วๆ ไป Bacteria ต้องเข้ายึดเกาะอนุภาคของ Fibre ก่อนทำการย่อยสลาย แต่มี Bacteria บางชนิดสามารถขับ Extracellular Enzymes ออกมาย่อยสลาย Fibre

การจำแนกตามการใช้ประโยชน์ของอาหารหรือผลผลิตที่สังเคราะห์ได้

1) Cellulolytic Bacteria

Bacteria กลุ่มนี้จะใช้ Cellulose โดยมีการผลิต Cellulase เข้าย่อยสลาย Cellulose นอกจากนี้อาจย่อย Cellobiose ซึ่งประกอบด้วย Glucose 2 โมเลกุล ได้ Bacteria กลุ่มนี้มีมากที่สุดใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
96512

กระเพาะ Rumen ของสัตว์ที่ได้รับอาหารหยาบเป็นหลัก Bacteria ชนิดที่สำคัญในกลุ่มนี้ได้แก่ *Ruminococcus flavefaciens, R. albus, Bacteroides succinogenes* ในบางขณะ *Cillobacterium cellulosolvens* และ *Clostridium spp.* ต่างๆ ก็มีส่วนช่วยในการย่อย Cellulose Hungate (1950) ทำการแยกเชื้อ Clostridium lochhaedii จาก Rumen ของโคที่ได้รับอาหารหยาบที่ผ่านการปรุงแต่งด้วยเกลือ (Salt-Treated Roughages) Clostridium lochhaedii ซึ่งเป็น Bacteria ที่มีการสร้าง Spore (ไม่เหมือนกับ Bacteria ชนิดอื่นๆ) มีความสามารถในการย่อยสลาย Cellulose ได้ดีกว่าจุลินทรีย์อื่นๆ หลายเท่า

2) Hemicellulolytic Bacteria

โดยปกติ Bacteria ที่ย่อย Cellulose ได้ก็จะสามารถย่อย Hemicellulose ได้ด้วย แต่ Bacteria ที่ย่อย Hemicellulose จะไม่สามารถย่อย Cellulose ได้ ชนิดที่สำคัญได้แก่ *Butyrivibrio fibrisolvens, Lachnosperia multiparens* และ *Bacteroides ruminicola* เป็นต้น

3) Amylolytic Bacteria

Bacteria ชนิดนี้จะมีเป็นจำนวนมากใน Rumen ของสัตว์ที่ได้รับอาหารข้นที่มี Amylose อยู่สูง ชนิดของ Bacteria ที่สำคัญได้แก่ *Bacteroides amylophilus, Succinimonas amylophilus, Butyrivibrio fibrisolvens, Selenomonas ruminantium, Streptococcus bovis* และ *Bacteroides ruminicola* เป็นต้น จะเห็นว่า Bacteria ที่สามารถย่อย Cellulose หลาย Species สามารถที่จะย่อย Carbohydrates ได้ด้วย แต่ Bacteria ที่ย่อย Carbohydrates โดยตรง ไม่สามารถที่จะย่อย Cellulose ได้

4) Acid-utilising Bacteria

มี Bacteria หลายชนิดที่สามารถใช้กรดต่างๆ ได้ เช่น กรด Formic, Acetic, Malic, Fumaric, Lactic และ Succinic Bacteria จำพวกนี้ได้แก่ *Veillonella gazogenes, V. alacalesceus, Propionic Bacterian sp., Selemonas ruminantium, Reptostreptococcus elsdenii และ Selemonas lactilytica* เป็นต้น

5) Proteolytic Bacteria

Bacteria หลายๆ Species จะใช้ Amino Acids เป็นแหล่งพลังงาน ได้แก่ *Bacteroides amylophilus, Clostridium sporogens* และ *Bacillus licheniformis* เป็นต้น

6) Ammonia-producing Bacteria

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

7) Methanogenic Bacteria

ที่สำคัญได้แก่ *Methanobacterium ruminatium* และ *M. formicicum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8) Lipolytic Bacteria

Bacteria หลายชนิดมีความสามารใช้ Glycerol แต่ยังไม่ทราบเป็นที่แน่ชัดว่า Species ใดที่มีความสามารถในการย่อย Lipid ได้ Glycerol

9) Vitamin-synthesising Bacteria

ถึงแม้จะทราบว่ามี Bacteria หลาย Species มีความสามารถในการสังเคราะห์ Vitamin B Complex ได้ แต่การศึกษายังไม่ทราบชัดว่าเป็น Species ใด

Rumen Bacteria ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลาย Cell Wall Polysaccharides ได้สรุปไว้ในตารางที่ 5 (วิศิษฐิพร, 2538)

ตารางที่ 5 Rumen Bacteria ที่ทำหน้าที่ย่อย Cell Wall Polysaccharides

Cell Wall Polysaccharides	Species
Cellulose	*Bacteroides succinogenes*
	Ruminococcus flavefaciens
	Ruminococcus albus
	Butyrivibrio fibrisolvens
	Cillobacterium cellulosolvens
	Clostridium lochlaedii
	Cellulomonas fimi
	Eubacterium spp.
Hemicellulose	*Butyrivibrio fibrisolvens*
	Ruminococcus flavefaciens
	Bacteroides ruminicola

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Cell Wall Polysaccharides	Species
Peptic Substances	All the Cellulolytic and Hemicellulolytic species. *Plus:* *Lachnospira multiparus* *Sterptococcus bovis* *Succinovibrio dextrinosolvens*

ที่มา : วิศิษฐิพร, 2538

จุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ย่อย Cellulose (Cellulolytic Microorganisms) จะผลิต Enzymes และขับออกมาเพื่อทำการย่อย Complex Structural Carbohydrates ให้เป็น Cellobiose, Glucose และ VFAs จุลินทรีย์ที่อยู่ในกระเพาะ Reticulo-rumen จะกระจายตัวอยู่ตามส่วนต่างๆ ในกระเพาะ แต่ที่จุลินทรีย์เกาะอยู่มากได้แก่ Fibre ใน Feed Particles และปะปนอยู่ใน Rumen Fluid การกระจายตัวของจุลินทรีย์ได้แสดงไว้ในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การกระจายตัวของ Bacteria ที่เกาะยึดกับผนังเซลล์หรือปะปนอยู่ใน Rumen Fluid

Genera	Composition(%)	
	Plant Cell Wall	Rumen fluid
Butyrivibrio	32	7
Selenomonas	14	10
Unnamed Spirochacte	8	0
Lachnospira	8	1
Megasphaera	0	11
Streptococcus	3	12
Ruminococcus	16	6
Bacteroides	11	38
Others	8	15

ที่มา : วิศิษฐิพร, 2538

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถ้าสัตว์ได้รับอาหารจำพวกน้ำตาล เช่น กากน้ำตาล เป็นหลัก ประชากรของ Bacteria ที่อาศัยอยู่ใน Rumen Fluid ที่ตรวจนับจะมีปริมาณน้อย (ตารางที่ 7) อาจเป็นไปได้ว่าสัตว์ที่ได้รับอาหารจำพวกน้ำตาลมาก จะมีปริมาณ Protozoa ใน Rumen มากด้วย และ Protozoa เหล่านี้จะใช้ Bacteria เป็นอาหารทำให้จำนวน Bacteria ลดลง แต่จำนวน Protozoa จะเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 7 จำนวน Bacteria ที่นับได้ *Lactobacilli* และ *Strepptococci* (x 10^9/ml) ใน Rumen ของโคที่ได้รับเมล็ดธัญพืช, หญ้าแห้งหรือกากน้ำตาล

	Grain	Hay	Molasses
Viable Bacteria	95.8	2.30	3.75
Lactobacillus	34.0		
Streptococcus	15.6	0.05	

ที่มา : วิศิษฐิพร, 2538

4.4.2 Protozoa (วิศิษฐิพร, 2538)

จะสามารถพบ Protozoa ในกระเพาะ Rumen (ตารางที่ 8) ของแกะและโคที่ได้รับอาหารที่มี Fibre อยู่สูง (แต่จะมี Soluble Sugar อยู่น้อย) แต่จะพบอยู่เป็นจำนวนน้อย (น้อยกว่า 100,000/ml.) แต่ถ้าสัตว์ได้รับอาหารจำพวกแป้งหรือน้ำตาล จะพบ Protozoa ใน Rumen จำนวนมาก อาจถึง 4,000,000/ml. ของ Rumen Fluid ฉะนั้นชนิดอาหารที่สัตว์กินเข้าไปจะเป็นตัวกำหนดชนิดและปริมาณของ Protozoa ในกระเพาะ Rumen ส่วนใหญ่จะพบ Protozoa จำพวก Ciliated Protozoa แต่ก็มีบางชนิดที่เป็น Flagellated Protozoa ซึ่งมักพบใน Rumen ของสัตว์ในระยะแรกเกิดเท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

ตารางที่ 8 แสดงการจำแนกชนิดของ Protozoa ในกระเพาะ Rumen

Group/Genus	CHO Substrate	Cellulose Degestion	Products
Holotrichs			
Isotricha	Starch, Sugar	0	Acetate, Butyrate, Lactate, H_2
Dasytricha	Starch, Sugar	0	Acetate, Butyrate, Lactate, H_2
Entodineomorphs			
Entodinia	Starch	0(+)	Formate, Acetate, Propionate, Butyrate
Epidinium	Starch, Hemicellulose	0	Acetate, Butyrate, H_2
Ophryoscolex	Starch	0	Acetate, Butyrate, H_2
Diplodinuim		+	
Eudiplodinium		+	H_2, Fatty Acids
Polyplastron		+	

ที่มา : วิศิษฐิพร, 2538

การจำแนกชนิดของ Protozoa ใน Rumen จำแนกเป็น Protozoa ที่มีขนาดเล็ก คือ Entodineomorphs (ส่วนใหญ่ได้แก่ *Entodinia spp.*) และ Protozoa ที่มีขนาดใหญ่คือ Holotrichs (ส่วนใหญ่ได้แก่ *Isotricha* หรือ *Dasytricha spp.*) มักพบ Protozoa จำพวก Entodineomorphs จำนวนมาก เมื่อสัตว์ได้รับอาหารจำพวกแป้งและ Fibre เป็นอาหารหลัก ในขณะที่จะพบ Protozoa จำพวก Holotrichs จำนวนมากเมื่อสัตว์ได้รับอาหารจำพวกน้ำตาลและ Fibre โดยเฉพาะหญ้าสดเป็นอาหารหลัก (วิศิษฐิพร, 2538)

Protozoa บางชนิดสามารถย่อย Cellulose ได้ แต่โดยปกติแล้ว Protozoa จะใช้ประโยชน์จากแป้งและน้ำตาลเป็นหลัก ในบางขณะจะพบ Protozoa เป็นจำนวนมาก อาจมีสัดส่วนสูงถึงร้อยละ 70 ของจุลินทรีย์ใน Rumen ทั้งหมด และจะพบ Bacteria เพียงร้อยละ 30 เท่านั้น

4.4.3 Phycomycetous Fungi

Anaerobic Fungi เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ใน Rumen ที่เพิ่งแยกเชื้อพบเมื่อไม่นานมานี้และยังพบว่ามีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการหมักย่อยอาหารใน Rumen Anaerobic Fungi จะฝังตัวเกาะอยู่ใน Fibre ของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนุภาคอาหาร และเชื่อว่ามีส่วนในการช่วยย่อยสลาย Cellulose สำหรับประชากร การเข้าย่อยสลายอนุภาคอาหารและความต้องการอาหาร รวมทั้ง N ของ Fungi เหล่านี้ ยังต้องศึกษาค้นคว้าต่อไป (เมธา, 2533)

Anaerobic Fungi มีการค้นพบในกระเพาะของสัตว์หลายชนิด เช่น โค แพะ แกะ และกวาง นอกจากนี้ยังพบใน Caecum ของม้า ช้าง และ จิงโจ้ ดังนั้น Fungi นี้ อาจอาศัยอยู่ในกระเพาะของสัตว์ที่กินพืชเป็นอาหารทุกชนิด และสามารถมีชีวิตอยู่ได้โดยสภาพไร้ออกซิเจน (เมธา, 2533)

Fungi ในระยะของการขยายพันธุ์จะประกอบด้วย Sporangium ซึ่งเกิดจากเส้นใย Rhizoids จะเจริญเติบโตบนผิวเนื้อเยื่อของพืช Sporangia ที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้วจะผลิต Zoospores เพื่อขยายพันธุ์ต่อไป Zoospored เหล่านี้จะเข้าย่อยสลาย Fibre ที่สัตว์กินเข้าไปใหม่ โดยเข้าทำลายส่วนต่างๆ ของพืช หรือเข้าทาง Stomata ของใบพืช แล้วเจริญเติบโตบนส่วนของพืชต่อไป (เมธา, 2533)

บทบาทของ Fungi เหล่านี้มีความสำคัญมาก มีการพบว่า Fungi จะเข้าย่อยสลายส่วนของ Fibre ในอาหารเป็นกลุ่มแรก โดยย่อยจากส่วนด้านในก่อน Fungi จะช่วยลดการจับยึดแน่นของ Feed Particles เป็นการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการบดย่อยอาหารในขณะเคี้ยวเอื้อง การเข้าย่อยสลายของ Fungi จะทำให้ Bacteria เข้ายึดเกาะและย่อยสลายเซลล์พืชได้ง่ายขึ้น Fungi กลุ่มนี้จึงเป็นตัวเริ่มต้นที่สำคัญของการย่อยสลาย Cell Wall ของพืชที่ย่อยสลายได้ยาก Fungi กลุ่มนี้ที่พบใน Rumen ของแกะได้แก่ *Neocallimastix frontalis, Piramonas communis* และ *Sphaeromonas communis* นอกจากนี้ Fungi กลุ่มนี้ยังช่วยย่อยสลายการจับตัวกันของ Hemicellulose-Lignin และ ช่วยทำให้ Lignin ละลายได้ใน Rumen (แต่ไม่ได้ย่อย Lignin โดยตรง) ซึ่งจะเป็นการเปิดโอกาสให้ Bacteria เข้าย่อยสลาย Fibre ได้ (วิศิษฐิพร, 2538)

5. การแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสจากธรรมชาติ

การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสได้ดี เริ่มต้นในศตวรรษที่ 19 โดยนักโรคพืชในสมัยนั้น ได้ทำการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากต้นพืชที่เป็นโรค พบเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศ (anaerobic bacteria) และเชื้อรา เป็นตัวสำคัญที่ทำให้ต้นพืชเกิดโรค การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสโดยเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ จะเกิดตรงบริเวณที่จุลินทรีย์เข้าทำอันตราย (สุนทร, 2516) หลังจากนั้นการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ก็ได้รับความสนใจมากขึ้น รวมไปถึงการศึกษาสูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ การนำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งในปัจจุบันการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ก็ยังคงปฏิบัติกันอยู่เช่น

พิพัฒน์ (2527) ได้ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสจากกระเพาะวัว ได้เชื้อแบคทีเรียทั้งสิ้น 113 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ที่สามารถที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้คือ สายพันธุ์ CU1, CU 3 และ CU4 พบว่าทั้งสามสายพันธุ์ เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อน โดยเพาะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ rumen Fluid Cellulose Agar (RFCA) และเมื่อย่อยสลายเซลลูโลสแล้วจะได้ อะซิเตท ซัคซิเนท ก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

พรเทพ (2538) ได้ทำการคัดแยกเชื้อรา ที่แยกจากดินบริเวณใต้ต้นป่านศรนารายณ์ และวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมทำเชือก จากอำเภอหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 41 ตัวอย่าง ดินบริเวณใต้ต้นป่านศรนารายณ์ เศษต้นและใบป่านศรนารายณ์ จากอำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี จำนวน 22 ตัวอย่าง และดินบริเวณใต้ต้นป่านศรนารายณ์ เศษต้นและใบป่านศรนารายณ์ 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

Hugate (1947) ได้ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสจากกระเพาะวัวพบเชื้อ *Bacteroides succinogenes* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ

Gashe (1992) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Trichoderma sp.* A-001 ที่คัดแยกได้จากกองปุ๋ยหมัก พบว่าเชื้อราสามารถเจริญได้ดีเมื่อใช้ CMC stover cardboard avicel กระดาษกรอง เปลือกข้าวบาเลย์ หญ้า และฟางข้าวสาลี เป็นแหล่งคาร์บอนแต่การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดเมื่อใช้กระดาษกรอง ที่ระดับความเข้มข้น 0.5% โดยเชื้อราผลิตเอนไซม์ CMCase, Fpase และ β-glucosidase มีค่า 167 18 และ 49 U/ml ตามลำดับ KNO_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.6% ช่วยให้เชื้อรามีการผลิตเอนไซม์ได้สูงกว่าการใช้ NH_4Cl และ urea เป็นแหล่งไนโตรเจน นอกจากนี้การใช้ tween 80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.2% ช่วยให้เชื้อรามีการผลิตเอนไซม์ CMCase เพิ่มขึ้นจาก 2.6 เป็น 23 เท่า, Fpase เพิ่มจาก 2 เป็น 60 เท่า และ β-glucosidase เพิ่มขึ้นจาก 3.8 เป็น 1,225 เท่า ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแหล่งคาร์บอนที่ใช้ สำหรับภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ คือ pH เริ่มต้น 5.2 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที และภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ทั้งสามชนิดคือ pH 5.5 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

Okeke และ Obi (1993) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Arthrographis* sp. ซึ่งคัดแยกได้จากกองปุ๋ยหมัก พบว่า อุณหภูมิ และ pH เริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ 30 องศาเซลเซียส pH เริ่มต้น 5.0 ถึง 6.0 โดยมีกระดาษกรองและ microcrystalline cellulose (MCC) ที่ระดับความเข้มข้น 1% เป็นแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ คือ NH_4NO_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.2% และยังพบว่าการเติม tween 80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1% ทำให้เชื้อรามีการผลิตเอนไซม์ exoglucanase endoglucanase และ β-glucosidase เพิ่มขึ้นจาก 2.10 เป็น 2.54 8.33 เป็น 13.37 และ 3.89 เป็น 5.97 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Foong และคณะ, (1997) ได้ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสจากกระเพาะวัว ในประเทศ Canada Japan Argentina และจากกระเพาะกระบือในประเทศ Malaysia พบเชื้อ *Fibrobacter succinogenes, Ruminococcus flavetaciens* และ *Butyrivibrio* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

ชื่อเครื่องมือ	รุ่นและบริษัท	ประเทศผู้ผลิต
เครื่องเซนติฟิวส์ (Centrifuge)	Kontron	อิตาลี
เครื่องชั่ง	Mettler PE 3000	ญี่ปุ่น
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Auto clave)	Tomy ss-245	ญี่ปุ่น
ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบไร้อากาศ (anaerobic jar)	Merck	เยอรมัน
Anaerocult® A	Merck	เยอรมัน

ตู้บ่มเพาะเชื้อ

ฟลาสก์

ปิเปต

จุกยาง

ลูกยาง

หลอดทดลองขนาดกลาง

ลวดเขี่ยเชื้อ

ตะเกียงแอลกอฮอล์

บีกเกอร์

จานอาหารเลี้ยงเชื้อ

แท่งแก้วคน

สารเคมี

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

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Rumen Fluid Cellolose Broth (RFCB) (ภาคผนวก ก)

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Cellulose Broth (CB) (ภาคผนวก ก)

สารละลาย Dinitrosalicylic acid (DNS) (ภาคผนวก ก)

1 M HCl (ภาคผนวก ก)

0.1 M citrate buffer pH 4.8 (ภาคผนวก ก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัตว์ทดลอง

วัวพันธุ์ผสมระหว่าง Holspyl Fresian และ Brahman จากคอกเลี้ยงสัตว์ของภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

ก. การเก็บตัวอย่างจากกระเพาะส่วนต้นของวัว

1. ทำการเก็บตัวอย่างหญ้าหมักจากกระเพาะส่วนต้นของวัว โดยทำการเก็บตัวอย่างในช่วงเวลาประมาณ 8.00 น. ก่อนการให้อาหาร
2. เตรียมภาชนะในการเก็บตัวอย่างโดยเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะส่วนต้นของวัว (Rumen Fluid) ในกระติกน้ำร้อนที่อุ่นกระติกน้ำร้อน โดยต้มน้ำเดือดใส่ลงไปก่อนทำการเก็บตัวอย่าง
3. เก็บตัวอย่างโดยเปิดฝาข้างลำตัววัวที่มีการผ่าตัดเจาะทำเป็นช่องแคนนูลา (cannula) ไว้แล้ว
4. นำตัวอย่างหญ้าหมักจากกระเพาะส่วนต้นของวัวมาทำการแยกของเหลว (rumen fluid) โดยการบีบตัวอย่างหญ้าหมักผ่านผ้าขาวบาง 4 ชั้น
5. ก่อนเทตัวอย่างของเหลวให้เทน้ำร้อนออกจากกระติกน้ำร้อน เพื่อควบคุมอุณหภูมิของกระติกน้ำร้อนให้มีอุณหภูมิประมาณ 39 องศาเซลเซียส
6. รีบเทตัวอย่างของเหลวที่แยกได้ลงในกระติกน้ำร้อนรีบปิดฝาให้สนิทเพื่อป้องกันอากาศเข้าไปได้
7. กรองด้วยผ้าขาวบางอีกครั้งก่อนนำไปทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ต่อไป

ข. การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากกระเพาะส่วนต้นของวัว (พิพัฒน์, 2527)

1. นำตัวอย่างมา 1 ลูป ใส่ลงในอาหาร RFCB (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาดกลาง นำไปบ่มเพาะเชื้อที่ตู้บ่มไร้อากาศ (anaerobic jar) อุณหภูมิ 37-39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. ใช้ลูปแตะเชื้อจากข้อ 1 ขีด (streak) บนจานอาหารวุ้นแข็งสูตร RFCA (ภาคผนวก ก) จำนวน 5 จาน
3. บ่มจากเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37-39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ในตู้บ่มไร้อากาศ (anaerobic jar) โดยกลับจานเพาะเชื้อให้ด้านที่มีวุ้นอยู่ด้านบน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ตรวจดูการสร้าง clear zone ของเชื้อจุลินทรีย์และลักษณะของโคโลนี เช่น สีของโคโลนี ผิวเรียบหรือผิวขรุขระ ทึบหรือใส
5. นำเชื้อที่เกิด clear zone มาแยกให้บริสุทธิ์อีกครั้ง โดยขีด (streak) ลงบนอาหารสูตร RFCA เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวบ่มเช่นเดียวกับข้อ 3 แล้วนำไปเก็บ (stock) ไว้ในหลอดอาหาร cellulose broth ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาดกลางเททับด้วยพาราฟินเหลว แล้วนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ค. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้สูง

1. ใช้เทคนิค point inoculation โดยนำเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้เป็นโคโลนีเดี่ยวๆ มาทำ point inoculation โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อแตะลงบนอาหารแข็งสูตร RFCA จานอาหารละ 2 เชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37-39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ในตู้บ่มไร้อากาศ และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีและ clear zone
2. คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลาง clear zone ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีสูงสุด ไปศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

ง. การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างจากเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือก (พรทิพย์, 2528 และพรเทพ 2538)

1. นำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกมาเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลวที่มี Carboxy Methyl Cellulose (CMC) 1.0% เป็นแหล่งคาร์บอนและประกอบด้วย peptone 0.5% KH_2PO_4 0.5% $MgSO_4.7H_2O$ 0.5% และ yeast extract 0.5% (ปรับ pH ด้วย 1 N HCl และ 1 N NaOH ให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่า pH = 7) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ในตู้บ่มไร้อากาศ (anaerobic jar)
3. ดูดกล้าเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลวที่มี CMC 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและประกอบด้วยธาตุอาหารอื่นๆ ตามข้อ 1. ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
4. บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มไร้อากาศ (anaerobic jar) เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลา 1, 3, 5, 7, 9, 12 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. นำไปปั่นด้วยเครื่องเซนติฟิวส์ (centrifuge) ความเร็ว 13000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
6. เก็บส่วนใสเพื่อใช้เป็น crude enzyme เพื่อใช้ศึกษาปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสโดยวิเคราะห์หา CMCase ต่อไป (ภาคผนวก ก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

ก. ตัวอย่างของเหลว (rumen fluid) จากกระเพาะส่วนต้นของวัว

ทำการเก็บตัวอย่างของเหลว (rumen fluid) จากกระเพาะส่วนต้นของวัว พันธุ์ผสมระหว่าง Holspyl Fresian และ Brahman จากคอกเลี้ยงสัตว์ของภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เพื่อนำมาคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้จำนวน 4 ครั้งๆละ 1 ตัวอย่าง ทำการเก็บตัวอย่างในช่วงเดือน ตุลาคม - พฤศจิกายน 2542 โดยมีการนำตัวอย่างอาหารจากกระเพาะส่วนต้นของวัว ซึ่งเก็บตัวอย่างหญ้าหมักโดยเปิดฝาข้างลำตัว (Cannula) ออก พบตัวอย่างหญ้าหมักมีสีเหลืองอมเขียว ดังแสดงในภาพที่ 6 ก และ ข จากนั้นนำมาบีบผ่านผ้าขาวบาง 4 ชั้น ได้ตัวอย่างของเหลวซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลวข้นๆ สีเหลืองอมเขียว แล้วเทตัวอย่างของเหลวที่แยกได้ลงในกระติกน้ำร้อน ปิดให้สนิทเพื่อป้องกันอากาศเข้าไป ดังภาพ 7 ก และ ข จากนั้นนำตัวอย่างของเหลวที่ได้ไปทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ต่อไป

ข. ผลการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากกระเพาะส่วนต้นของวัว

จากการศึกษาเมื่อนำตัวอย่างของเหลวหรือน้ำย่อยจากกระเพาะส่วนต้นของวัวมาคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์โดย pre-enrich ในอาหารเหลวสูตร Rumen Fluid Cellulose Broth (RFCB) บ่มที่อุณหภูมิ 37-39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ว streak บนอาหารวุ้นแข็งสูตร Rumen Fluid Cellulose Agar (RFCA) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37-39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ในตู้บ่มไร้อากาศ ดังภาพที่ 8 สังเกตสีของอาหารวุ้นแข็งสูตร RFCA ในวันที่ 1 สีของอาหารวุ้นแข็งสูตร RFCA จะมีสีแดงอ่อน หลังจากบ่มเป็นเวลา 1 สัปดาห์สีของอาหารวุ้นแข็งสูตร RFCA จะมีสีแดงปนเหลือง และเมื่อบ่มเป็นเวลา 3 สัปดาห์ สีของอาหารแข็งสูตร RFCA จะมีสีแดงปนเหลืองอ่อน และมีไอน้ำเกิดขึ้นภายในตู้บ่มไร้อากาศ และเมื่อสังเกตการเจริญของจุลินทรีย์พบมีการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิดเกิดขึ้น จุลินทรีย์บางชนิดมีการสร้างบริเวณใส (clear zone) และลักษณะโคโลนีดังภาพที่ 9 ก และ ข จากการทดลองทำการเก็บตัวอย่าง 4 ครั้ง จะมีการนำตัวอย่างของเหลว 1 หลุมใส่ลงในอาหารแข็.สูตร RFCA ซึ่งสามารถแยกได้เป็น 13 ตัวอย่าง พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างบริเวณใส (clear zone) บนอาหารแข็งสูตร RFCA ได้ทั้งสิ้น 14 สายพันธุ์ และเนื่องจากอาหารแข็งสูตร RFCA มีส่วนประกอบของ Cellulose ดังนั้นเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างบริเวณใส (clear zone) บนอาหารแข็งสูตร RFCA ได้ แสดงว่าจุลินทรีย์นั้นสามารถย่อย cellulose ในอาหารแข็งสูตร RFCA ได้ ซึ่งจะเป็นจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส โดยลักษณะสีโคโลนีของจุลินทรีย์ที่พบมีสีเหลืองปนส้ม สีเหลืองอ่อน สีเหลือง สีขาว และสีขาวปนเทา ดังตารางที่ 9 และเมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ที่มีบริเวณใส (clear zone) ล้อมรอบโคโลนี มาแยกให้บริสุทธิ์อีกครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.

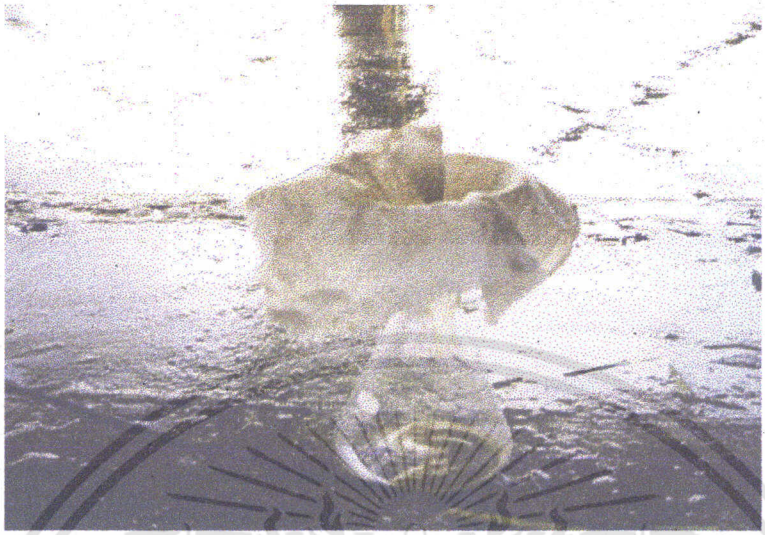
ข.

ภาพที่ 6 วิธีการเก็บตัวอย่างจากกระเพาะส่วนต้นของวัว

ก. การเก็บตัวอย่างหญ้าหมักโดยเปิดฝาแคนนูลาออก

ข. ตัวอย่างหญ้าหมักจากกระเพาะส่วนต้นของวัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก.

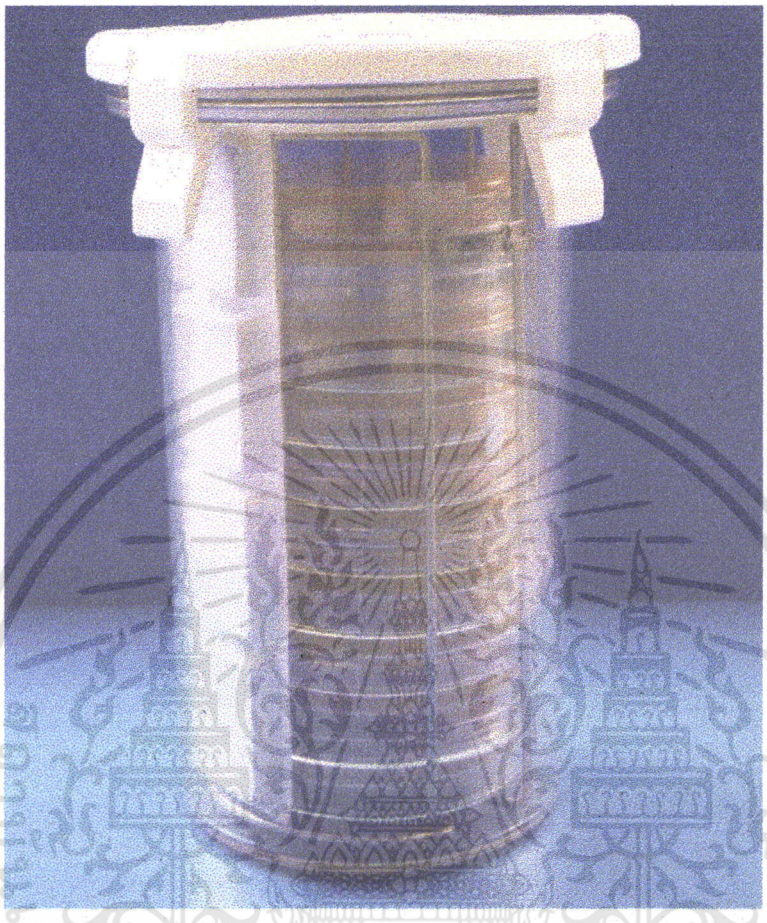
ข.

ภาพที่ 7 ตัวอย่างของเหลว (Rumen Fluid) จากกระเพาะส่วนต้นของวัว

ก. ของเหลว (Rumen fluid) ที่แยกได้จากตัวอย่างหญ้าหมักโดยการกรองด้วยผ้าขาวบาง

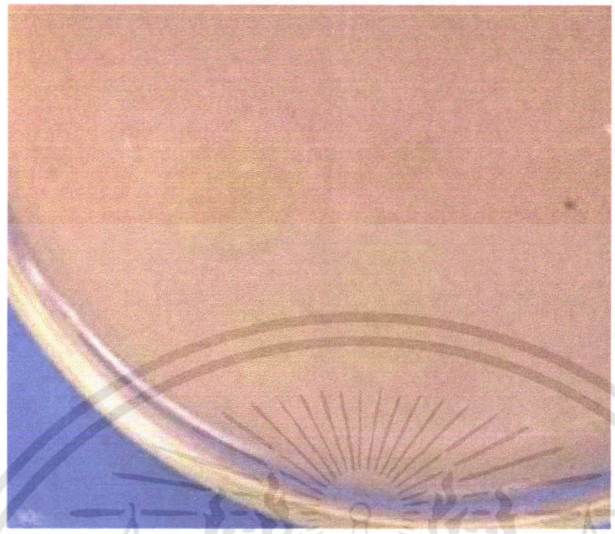
ข. ลักษณะตัวอย่างของเหลว (Rumen fluid) ที่ถ่ายลงในกระติกน้ำร้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

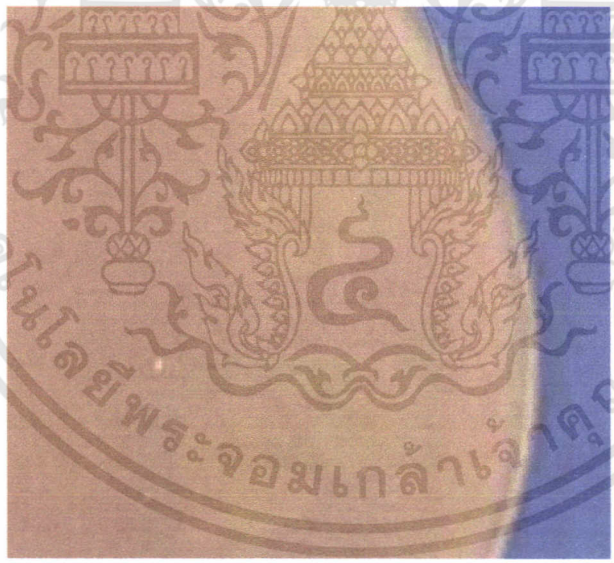


ภาพที่ 8 การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในจานอาหารวุ้นแข็งสูตร Rumen Fluid Cellulose Agar (RFCA) ที่บ่มในตู้บ่มไร้อากาศ (anaerobic jar) เป็นเวลา 3 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก.



ข.

ภาพที่ 9 ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ที่มีบริเวณใส บนอาหารแข็งสูตร Rumen Fluid Cellulose Agar (RFCA) เป็นเวลา 3 สัปดาห์

ก. ด้านหน้าของจานเพาะเชื้อ

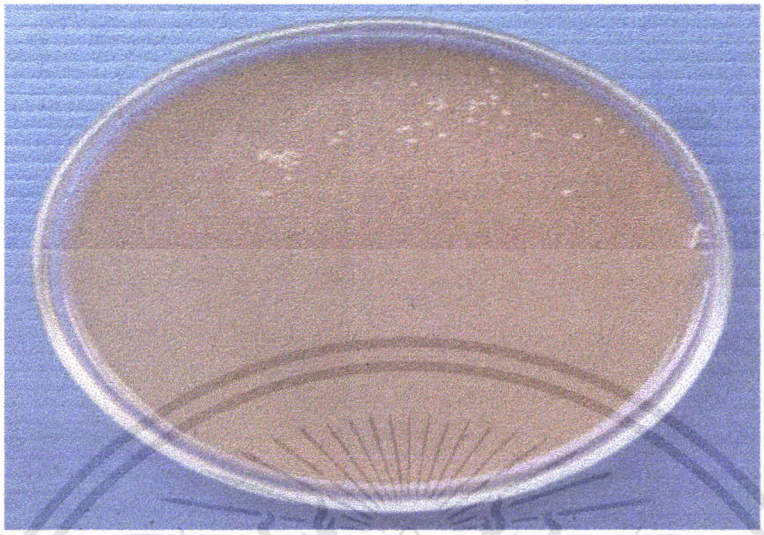
ข. ด้านหลังของจานเพาะเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งแยกได้จากกระเพาะส่วนต้นของวัวบนอาหารแข็งสูตร Rumen Fluid Cellulose Agar (RFCA) ที่อุณหภูมิ 37-39 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ในตู้บ่มไร้อากาศ

ตัวอย่างที่	สายพันธุ์ที่	สีโคโลนีของเชื้อ
1	1	สีขาว
	2	สีเหลืองอ่อน
2	3	สีเหลือง
3	4	สีขาวปนเทา
4	5	สีเหลืองปนส้ม
5	6	สีเหลืองปนขาว
6	7	สีเหลือง
7	8	สีขาว
8	9	สีเหลืองปนส้ม
9	10	สีเหลือง
10	11	สีเหลืองอ่อน
11	12	สีขาว
12	13	สีขาว
13	14	สีเหลืองปนส้ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 10 ลักษณะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร Rumen Fluid Cellulose Agar (RFCA) เป็นเวลา 3 สัปดาห์

ภาพที่ 11 เชื้อแบคทีเรียที่ไว้ในหลอดอาหาร cellulose broth เททับด้วยพาราฟินเหลว แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดย streak ลงบนอาหารสูตร RFCA โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37-39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ใน ตู้บ่มไร้อากาศจะได้โคโลนีเดี่ยว ดังภาพที่ 10 แล้วนำไปคัดเลือกสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงและเก็บไว้ในหลอดอาหาร cellulose broth เททับด้วยพาราฟินเหลว นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในตู้เย็น เพื่อทำการศึกษาต่อไป ดังแสดงในภาพที่ 11

และจากรายงานของ พิพัฒน์ (2527) ได้ทำการศึกษาการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสจากกระเพาะวัว โดย pre-enrich ในอาหารเหลวสูตร Rumen Fluid Cellulose Broth (RFCB) บ่มที่อุณหภูมิ 37-39 เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง แล้ว streak ลงบนอาหารวุ้นแข็งสูตร RFCA บ่มที่อุณหภูมิ 37-39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ และนำเชื้อที่มีบริเวณใส (clear zone) ล้อมรอบโคโลนีมาแยกให้บริสุทธิ์ แล้วนำเชื้อที่แยกได้เป็นโคโลนีเดี่ยวไปเก็บไว้ในหลอดอาหารเหลว Cellulose Broth ได้เชื้อแบคทีเรียทั้งสิ้น 113 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ดี คือสายพันธุ์ CU1, CU3 และ CU4 ดังนั้นในการศึกษาเบื้องต้นในการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสจากกระเพาะส่วนต้นของวัว ซึ่งมีการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกันทำให้ทราบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญในอาหารเหลวสูตร RFCB, อาหารแข็งสูตร RFCA และอาหารเหลว Cellulose Broth นั้นเป็นเชื้อแบคทีเรีย

ค. ผลการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้สูง

จากการใช้เทคนิค point inoculation โดยนำเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้เป็นโคโลนีเดี่ยวๆ มาทำ point inoculation บนจานอาหารแข็งสูตร RFCA บ่มที่อุณหภูมิ 37-39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ในตู้บ่มไร้อากาศ สามารถวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี และ clear zone พบว่าสายพันธุ์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง clear zone สูงสุดคือ สายพันธุ์ 5 รองลงมาคือ สายพันธุ์ที่ 2 โดยที่อัตราส่วนระหว่างบริเวณวงใสรอบโคโลนีกับโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ถ้ามีอัตราส่วนสูงแสดงว่าเชื้อมีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงกว่าเชื้อที่อัตราส่วนที่ต่ำ ดังตารางที่ 10 พบว่าสายพันธุ์ที่มีอัตราส่วนระหว่างบริเวณวงใสรอบโคโลนีกับโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์สูงสุดคือ สายพันธุ์ที่ 5 รองลงมาคือสายพันธุ์ที่ 2 โดยมีอัตราส่วนระหว่างบริเวณวงใสรอบโคโลนีกับโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์เท่ากับ 6 และ 3 ตามลำดับ และเมื่อสังเกตุสายพันธุ์อื่น พบว่าอัตราส่วนระหว่างบริเวณวงใสรอบโคโลนีกับโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นมีค่าน้อยกว่าสายพันธุ์ที่ 5 และสายพันธุ์ที่ 2 จากขั้นตอนนี้ทำให้สามารถคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสสูงสุด 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ที่ 2 และสายพันธุ์ที่ 5 เพื่อไปศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส จากผลที่ได้จะเห็นได้ว่าสอดคล้องกับผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากกระเพาะวัวของพิพัฒน์ (2527) ซึ่งนำตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะวัวมาคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ทั้งสิ้น 113 สายพันธุ์ พบสายพันธุ์ที่มีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้สูง 3 สายพันธุ์ โดยที่อัตราส่วนระหว่างบริเวณวงใสรอบโคโลนีกับโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียขึ้นอยู่กับความสามารถของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากกระเพาะส่วนต้นของวัว โดยใช้เทคนิค Point Inoculation บนอาหารแข็งสูตร Rumen Fluid Cellulose Agar (RFCA) บ่มที่อุณหภูมิ 37-39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ในตู้บ่มไร้อากาศ

สายพันธุ์ที่	เส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (เซนติเมตร)	เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (เซนติเมตร)	อัตราส่วนระหว่างบริเวณใสรอบโคโลนีกับขนาดโคโลนีของเชื้อ
1	0.66	0.50	1.32
2	0.90	0.30	3
3	0.40	0.30	1.33
4	0.40	0.40	1
5	1.20	0.20	6
6	0.40	0.40	1
7	0.80	0.40	2
8	0.60	0.40	1.5
9	0.20	0.40	0.5
10	0.40	0.30	1.33
11	0.40	0.30	1.33
12	0.40	0.20	2
13	0.20	0.20	1
14	0.20	0.50	0.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ถ้ามีอัตราส่วนสูง แสดงว่าเชื้อมีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงกว่าเชื้อที่ให้อัตราส่วนนี้ต่ำ

ง. ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือก

นำเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 2 และ 5 ที่คัดเลือกมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี Carboxy Methyl Cellulose (CMC) 1.0% เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มเชื้อในตู้บ่มไร้อากาศอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างส่วนใสเป็นระยะ 1, 3, 5, 7, 9 และ 12 วัน เพื่อใช้เป็น crude enzyme ศึกษาปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสโดยวิเคราะห์หา CMCase จากตารางที่ 11 และภาพที่ 12 พบว่า เชื้อแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุดคือ สายพันธุ์ที่ 5 โดยให้ค่า CMCase เท่ากับ 8.991 U/ml ที่ระยะเวลา 12 วัน และมีอัตราส่วนระหว่างบริเวณใสรอบโคโลนีกับขนาดโคโลนีของเชื้อ เท่ากับ 6 ซึ่งเป็นค่าสูงสุด และจากกราฟจะเห็นได้ชัดเจนว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 5 สร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 2 โดยสังเกตุจากเส้นกราฟพบว่าสายพันธุ์ที่ 5 มีความชันของเส้นกราฟมากกว่าเส้นกราฟของสายพันธุ์ที่ 2 ซึ่งแสดงถึงค่า CMCase ที่มากกว่า ดังนั้นจึงมีการศึกษาถึงลักษณะของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 5 ต่อไป

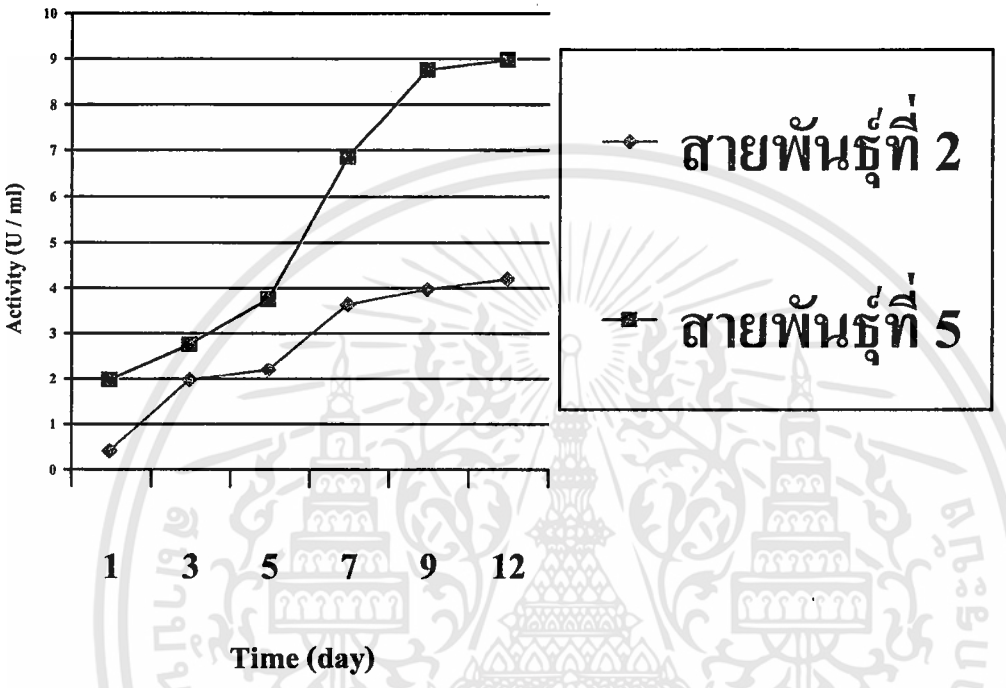
ตารางที่ 11 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างจากเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกโดยวิเคราะห์หาCMCase

สายพันธุ์ที่	Carboxy Methyl Cellulose Activity (U/ml)					
	1 วัน	3 วัน	5 วัน	7 วัน	9 วัน	12 วัน
2	0.444	1.998	2.220	3.663	3.996	4.218
5	1.998	2.775	3.774	6.882	8.769	8.991

จ. ลักษณะของแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดซึ่งแยกได้จากกระเพาะส่วนต้นของวัว

เลือกสายพันธุ์ที่ 5 มาทำการย้อมสีเพื่อศึกษาลักษณะของแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดซึ่งแยกได้จากกระเพาะส่วนต้นของวัว พบว่าเซลล์จะติดสีน้ำเงินซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก โดยมีรูปร่างกลม เซลล์ต่อกันเป็นสาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 12 กราฟแสดงกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างจากเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาเบื้องต้นในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสจากกระเพาะส่วนต้นของวัวสามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1. สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสในกระเพาะส่วนต้นของวัว โดยเก็บรวบรวมสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ทั้งหมด 14 สายพันธุ์ ซึ่งจะเป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้าง clear zone บนอาหาร RFCA บ่มที่อุณหภูมิ 37-39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ในตู้บ่มไร้อากาศ

2. จากการศึกษาการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงพบว่า สายพันธุ์ที่มีอัตราส่วนระหว่างบริเวณวงใสรอบโคโลนีกับขนาดของโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียสูงสุดคือ สายพันธุ์ที่ 5 รองลงมาคือสายพันธุ์ที่ 2 โดยอัตราส่วนระหว่างบริเวณใสรอบโคโลนีกับโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย ขึ้นอยู่กับความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ถ้ามีอัตราส่วนสูงแสดงว่าเชื้อมีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงกว่าเชื้อที่ให้อัตราส่วนที่ต่ำ ซึ่งสายพันธุ์ที่ 5 มีอัตราส่วนระหว่างบริเวณวงใสรอบโคโลนีกับโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์เท่ากับ 6 และสายพันธุ์ที่ 2 มีอัตราส่วนระหว่างบริเวณวงใสรอบโคโลนีกับโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์เท่ากับ 3

3. จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 2 และสายพันธุ์ที่ 5 พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด คือ สายพันธุ์ที่ 5 ให้ค่า CMCase 8.991 U/ml ที่ระยะเวลา 12 วัน

4. จากการศึกษาลักษณะของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 5 พบว่าเป็นแบคทีเรียที่มีสีเหลือง โคโลนีกลม ติดสีแกรมบวก เซลล์รูปร่างกลม เรียงต่อกันเป็นสาย

จากการศึกษาทำให้สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสจากกระเพาะส่วนต้นของวัว โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีองค์ประกอบของเซลลูโลส และเป็นแนวทางหนึ่งในการคัดเลือกแบคทีเรียเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการเพิ่มคุณค่าของวัตถุดิบเหลือทิ้งจากการเกษตรต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

1. จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 2 และสายพันธุ์ที่ 5 พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด คือ สายพันธุ์ที่ 5 ให้ค่า CMCase 8.991 U/ml ที่ระยะเวลา 12 วันดังนั้นควรมีการศึกษาต่อไปว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 5 เป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่าอย่างไร
2. จากการเก็บตัวอย่างของเหลว (rumen fluid) จากกระเพาะส่วนต้นของวัว พันธุ์ผสมระหว่าง Holspyl Fresian และ Brahman จากคอกเลี้ยงสัตว์ของภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เพื่อนำมาคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส พบว่ามีการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิดเกิดขึ้น ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมว่าในกระเพาะส่วนต้นของวัวต่างสายพันธุ์กันจะมีเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมือนหรือแตกต่างกันอย่างไร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

พรทิพย์ ตัณฑ์เจริญรัตน์. 2528. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อ แอคติโนมัยสีทรหัส 24402. วิทยานิพนธ์เกษตรศาสตร์.

พรเทพ ถนนแก้ว. 2538. ภาวะเหมาะสมของการผลิตเซลลูเลสจากเชื้อราที่คัดแยกจากบริเวณปลูกป่าศรนารายณ์. วิทยานิพนธ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พรรณทิพา ธงทอง. 2542. การเปรียบเทียบเทคนิคการประเมินค่าการย่อยได้ของอาหารพลังงาน. ปัญหาพิเศษภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์. คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พิพัฒน์ ศรีเบญจลักษณ์. 2527. การผลิตซีวก๊าซจากเซลลูโลสโดยใช้เชื้อคู่. วิทยานิพนธ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เมธา วรรณพัฒน์. 2533. โภชนศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ฟันนี่พับบลิชชิ่ง. กรุงเทพฯ.

วิโรจน์ ภัทรจินดา. 2540. อาหารและการจัดการฟาร์มโคนมขนาดใหญ่. ภาควิชาผลิตสัตว์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วิศิษฐิพร สุขสมบัติ. 2538. เอกสารประกอบการเรียนการสอนโภชนศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง. สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

สุนทร วงศ์สวัสดี. 2516. การแยกเชื้อราและศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสของเชื้อรา. วิทยานิพนธ์ ปริญญามหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Benoit, L., Cailliez, C., Petitdemange, E., and Gittton, J. 1992. Isolation of cellulolytic mesophilic Clostridia from a municipal solid waste digestor. Microbial and Ecology 23 : 117-125.

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

Gashe, B.A. 1992. Cellulase production and activity by Trichoderma sp. A-001. Journal of Applied Bacteriology 73 : 79-82.

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hungate, R.E. 1950. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. Bacteriology. Rev. 14 : 1-49.

Nisizawa, K. 1973. Mode of the action of cellulases. Journal of Fermentation Technology 51 : 267-304.

Okeke, B.C., and Obi, S.K.C. 1993. Production of cellulolytic and xylanolytic enzyme by an Arthrographis species. World Journal of Microbiology and Biotechnology 9 : 345-349.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

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
Cysteine Hydrochloride	0.05	กรัม
Distilled Water	224.5	มิลลิลิตร
Final pH 7.0		

Cellulose Broth (CB)

Inorganic Salt Solution	200	มิลลิลิตร
Resazurin (0.1% Solution)	0.5	มิลลิลิตร
Cellulose	7	กรัม
Cysteine Hydrochloride	0.05	กรัม
Trace Minerals (Balch)	5	มิลลิลิตร
Trace Vitamins (Balch)	5	มิลลิลิตร
Distilled Water	289.5	มิลลิลิตร
Final pH 7.0		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Inorganic Salt Solution

$(NH_4)_2SO_4$	1.25	กรัม
Na_2HPO_4 $12H_2O$	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

Trace Minerals

Nitrilotriacetic acid	1.5	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3.0	กรัม
$MnSO_4 \cdot 2H_2O$	0.5	กรัม
NaCl	1.0	กรัม
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	กรัม
$CoCl_2$	0.1	กรัม
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.1	กรัม
$ZnSO_4$	0.1	กรัม
$CuSO_4 \cdot H_2O$	0.01	กรัม
AIK $(SO_4)_2$	0.01	กรัม
H_3BO_3	0.01	กรัม
$Na_2MaO_4 \cdot 2H_2O$	0.01	กรัม
Distilled Water	1000	มิลลิลิตร
Final pH 7.0		

Trace Vitamins

Biotin	2	มิลลิกรัม
Folic	2	มิลลิกรัม
Pyridoxine Hydrochlaride	10	มิลลิกรัม
Thiamine Hydrochloride	5	มิลลิกรัม
Riboflavin	5	มิลลิกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nicotinic Acid	5	มิลลิกรัม
DL-calcium Pantothenate	5	มิลลิกรัม
Vitamin B_{12}	0.1	มิลลิกรัม
P-aminobenzoic Acid	5	มิลลิกรัม
Lipoic Acid	5	มิลลิกรัม
Distilled Water	1000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม RFCA, RF CB และ CB

1. ใส่ส่วนประกอบต่างๆ ลงไปตามสูตรอาหารที่มีให้ ยกเว้น Trace Vitamin และ cysteine hydrochloride ลงในฟลาสก์ขนาด 1000 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร คนให้ส่วนประกอบต่างๆ เข้ากันแล้วนำไปตั้งไฟต้มให้เดือด
3. ระหว่างการต้มให้ใส่ cysteine hydrocholride ลงไปต้มให้ส่วนประกอบต่างๆ ละลายหมด
4. นำไปเก็บที่ตู้ไร้อากาศ หรือระวังอย่าให้อากาศเข้า
5. เติม trace vitamin ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงไปคนให้เข้ากัน
6. ปิดฟลาสก์ด้วยจุกยางแล้วคลุมด้วยผ้าเพื่อป้องกันแสง นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที
7. ก่อนจะนำอาหาร RFCA, RFCB และ CB ไปใช้ควรมีการทำทิ้งไว้ค้างคืนก่อน 1 คืน

วิธีการเตรียม Trace Minerals

1. ละลาย Nitrilotriacetic acid 1.5 กรัม ลงในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตร
2. ปรับค่า pH เท่ากับ 6.5 โดยการเติม KOH
3. เติมสารตัวอื่นๆ ลงไป จากนั้นปรับน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลาย DNS (Dinitrosalicylic acid) (พรเทพ, 2538)

1. เตรียมสารละลาย NaOH 10 % ปริมาตร 22 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในสารละลาย phenol 10 กรัม เติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน เทแบ่งออกมา 96 มิลลิลิตร เติม $NaHSO_3$ 9.6 กรัม คนให้เข้ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เตรียมสารละลาย DNS 1 % ปริมาตร 880 มิลลิลิตร และเตรียมสารละลาย Rochell salt 255 กรัม ด้วยสาระลาย NaOH 4.5 % ปริมาตร 300 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเทรวมกับสารละลาย DNS 1 % คนให้เข้ากัน
3. นำสารละลายที่ได้จากข้อ 1 และ 2 มาเทรวมกัน ก็จะได้สารละลาย DNS สารละลายนี้ต้องใส่ไว้ในขวดสีชา แล้วนำไปใส่ไว้ในตู้เย็นก่อนอย่างน้อย 1 คืน จึงจะนำไปใช้ได้

การเตรียม 0.05 M citrate buffer pH 4.8 (พรเทพ, 2538)

1. ชั่ง sodium citrate มา 14.71 กรัม ละลายในน้ำกลั่นเล็กน้อย
2. เติม 1 M HCl ลงไป 70 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน
3. เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน

ถ้าเตรียม 0.1 M citrate buffer pH 4.8 ใช้ sodium citrate 29.42 กรัม

การเตรียม 1 M HCl (พรเทพ, 2538)

ตวง HCl เข้มข้น มา 97.33 มิลลิลิตร เติมน้ำให้ครบ 1000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน

2. การทำกราฟน้ำตาลมาตรฐาน (พรเทพ, 2538)

1. เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสให้มีความเข้มข้น 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ใส่ในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลาย DNS ลงไปหลอดละ 3 มิลลิลิตร นำไปตั้งในน้ำเดือดนาน 5 นาทีตั้งทิ้งไว้ให้เย็น
3. เติมน้ำกลั่นลงไปทุกหลอดๆละ 10 มิลลิลิตร
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 550 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างค่า OD กับปริมาณน้ำตาลกลูโคส

3. การวัดปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสโดยการวิเคราะห์หา CMCase ตามวิธีการของ Acebal (พรเทพ, 2538)

1. นำ crude enzyme มา 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดสอบ
2. เติม 0.1 M citrete buffer pH 4.8 ปริมาตร 0.95 มิลลิลิตร และเติม 2 % Caroxy Methyl Cellulose (CMC) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
3. นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. เติมสารละลาย DNS reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด นาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
5. เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 550 นาโนเมตร เทียบกับหลอดควบคุม ที่เตรียมจาก 0.1 M citrate buffer แทน 2 % CMC จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่า unit of enzyme จากสูตรมาตรฐาน

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

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายซับสเทรตให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ใช้ทดสอบ

นั่นคือ

1 หน่วยของเอนไซม์ = 1 u mole ของซับสเทรตที่ถูกย่อยใน 1 นาที

= 1 u mole ของกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที

= 0.180 มิลลิกรัมกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที

ในกรณีการคำนวณค่า CMCase จะได้ว่า

ถ้า 0.180 มิลลิกรัมกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที มีค่า = 1 หน่วย

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

มีค่า = 0.555

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

จากการทดลองใช้เอนไซม์ 0.05 มิลลิลิตร = (x) x (0.555) หน่วย

ถ้าใช้เอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร = $\frac{(x) \times (0.555)}{0.05}$ หน่วย

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

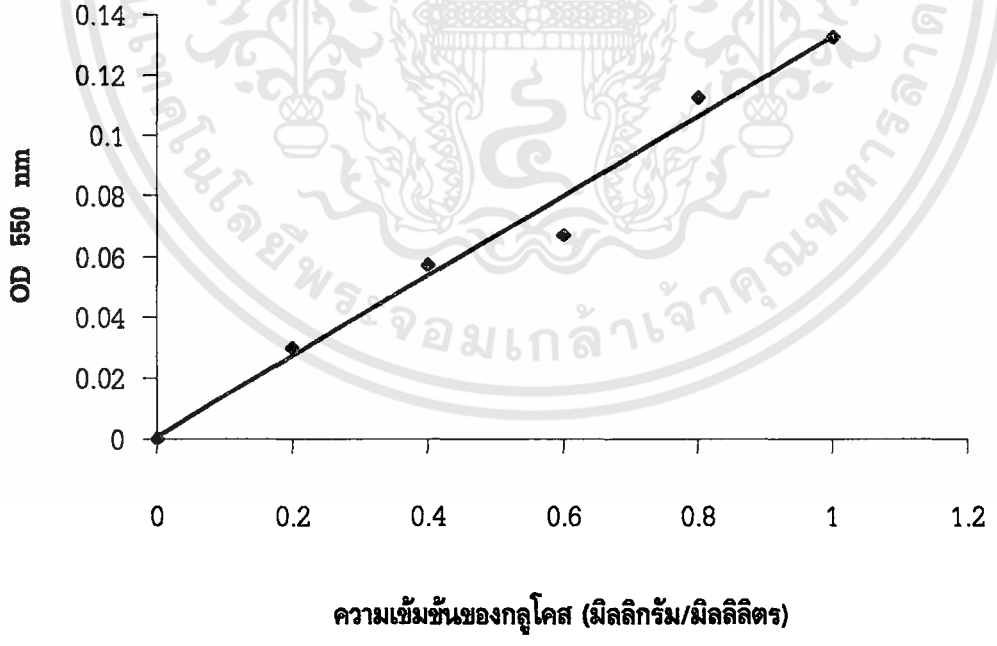
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

1. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

ตารางที่ 12 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ของสารละลายน้ำตาลกลูโคส

สารละลายน้ำตาลกลูโคส (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร (OD 550 nm)
0	0
0.2	0.03
0.4	0.057
0.6	0.067
0.8	0.113
1.0	0.113



ภาพที่ 13 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ของสารละลายน้ำตาลกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างจากเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือก

สายพันธุ์ที่ 2

ตารางที่ 13 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างจากเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ 2 ที่คัดเลือกได้จากกระเพาะส่วนต้นของวัว

เวลา (วัน)	น้ำตาลกลูโคส		Unit of enzyme* (U/ml)
	OD 550 nm	มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	
1	0.005	0.04	0.444
3	0.022	0.18	1.998
5	0.028	0.20	2.220
7	0.042	0.33	3.663
9	0.049	0.36	3.996
12	0.054	0.38	4.218

*สูตรหาค่า unit of enzyme = $\frac{(x) \times (0.555)}{0.05}$

กำหนดให้ x คือ ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สายพันธุ์ที่ 5

ตารางที่ 14 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างจากเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ 5 ที่คัดเลือกได้จากกระเพาะส่วนต้นของวัว

เวลา (วัน)	น้ำตาลกลูโคส		Unit of enzyme* (U/ml)
	OD 550 nm	มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	
1	0.022	0.18	1.998
3	0.036	0.25	2.775
5	0.044	0.34	3.774
7	0.083	0.62	6.882
9	0.108	0.79	8.769
12	0.110	0.81	8.991

*สูตรหาค่า unit of enzyme = $\frac{(x) \times (0.555)}{0.05}$

กำหนดให้ x คือ ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นายธนาสิน ธนอนันต์โชค ชื่อเล่น สิน เกิดเมื่อวันที่ 29 กุมภาพันธ์ 2519 เป็นชาวจังหวัดกรุงเทพมหานคร โดยกำเนิด ประวัติการศึกษา จบชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนราชวินิตบางแก้ว ปัจจุบันศึกษาอยู่ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ระดับปริญญาตรีหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร)

นางสาวสุภาพรรณ โรจน์อัมพร ชื่อเล่น เอ้ เกิดเมื่อวันที่ 13 สิงหาคม 2521 เป็นชาวจังหวัดกรุงเทพมหานคร โดยกำเนิด ประวัติการศึกษา จบชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนสตรีนนทบุรี ปัจจุบันศึกษาอยู่ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ระดับปริญญาตรีหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีการหมัก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้