



## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยเอนไซม์จากแบคทีเรียในกระเพาะหมัก  
ของกระบือ

Degradation of Agricultural Residues by Enzymes from Bacteria in  
Buffalo Rumen

ผศ.ดร. กัญญา จิระเจริญรัตน์

รศ.ดร. กานต์ สุขสุแพทย์

รศ.ดร. จำรูญ เล้าสินวัฒนา

ผศ.ดร. กนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้คณะเทคโนโลยีการเกษตร

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง



ชื่อโครงการ การย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยเอนไซม์จากแบคทีเรียในกระเพาะหมักของกระบือ  
แหล่งเงิน เงินรายได้คณะเทคโนโลยีการเกษตร

ประจำปีงบประมาณ 2555 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 400,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2554 ถึง 30 กันยายน 2555

หัวหน้าโครงการ ผศ.ดร. กัญญา จิระเจริญรัตน์

สังกัดภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระ  
จอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ผู้ร่วมโครงการวิจัย รศ.ดร. กานต์ สุขสุแพทย์ รศ.ดร. จำรูญ เล้าสินวัฒนา และ ผศ.ดร. กนกรัตน์ ศรีกิจ  
เกษมวัฒน์

สังกัดภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระ  
จอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

### บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้จัดทำขึ้นเพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากกระเพาะหมักของกระบือปลักที่สามารถ  
ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสร่วมกับไซแลนเนสและประเมินการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร จากการศึกษา  
พบว่า เชื้อไอโซเลทหมายเลข ID2R1P1 และ ID2R1P2 สามารถย่อยอาหารแข็ง CMC agar และ xylan  
agar ได้ดี ไอโซเลท ID2R1P1 มีความเหมือนของยีน 16S rRNA กับเชื้อ *Corynebacterium* sp.  
(X89778.1) 99% ขณะที่ไอโซเลท ID2R1P2 มีความเหมือนกับยีนของ *Bacillus pumilus* 96% เชื้อไอ  
โซเลท ID2R1P1 ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุดเมื่อบ่มในอาหารที่มี 1% CMC และ 0.1% yeast  
extract ที่อุณหภูมิ 39°C pH 7.0 เป็นเวลา 2 วัน และผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงใน  
อาหารเหลวที่มี 2% xylan และ 0.1% yeast extract ที่อุณหภูมิ 37°C pH 3.0 เป็นเวลา 2 วัน  
สภาวะการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนส คือ บ่มที่อุณหภูมิ 50°C pH 7.0 นาน 10 นาที  
และบ่มที่อุณหภูมิ 90°C pH 7.0 นาน 5 นาที ตามลำดับ เอนไซม์ยังสามารถย่อยอะโวเซลและกระดาศ  
กรองได้ดี ขณะที่เชื้อไอโซเลท ID2R1P2 ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุดเมื่อบ่มในอาหารที่มี 3% CMC  
และ 0.1% yeast extract ที่อุณหภูมิ 37°C pH 5.0 เป็นเวลา 5 วัน และผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้ดี  
ที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี 1% xylan และ 0.1% yeast extract ที่อุณหภูมิ 39°C pH 4.0 เป็น  
เวลา 3 วัน สภาวะการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนส คือ บ่มที่อุณหภูมิ 50°C pH 5.0  
นาน 10 นาที และบ่มที่อุณหภูมิ 70°C pH 8.0 นาน 10 นาที ตามลำดับ เอนไซม์สามารถย่อยกระดาศ  
กรองได้เล็กน้อย ใบบ่อยสามารถใช้ในการผลิตเซลลูเลสได้ดี ขณะที่ต้นข้าวโพดและฟางข้าวสามารถใช้ใน  
การผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้ดี เมื่อนำฟางข้าวผ่านการอบด้วยคลื่นไมโครเวฟนาน 30 นาที และนำใ  
บย่อยและต้นข้าวโพดผ่านการอบด้วยความดันไอน้ำนาน 20 นาที พบว่า เอนไซม์สกัดจากไอโซเลท  
ID2R1P1 สามารถย่อยใบบ่อยและต้นข้าวโพดได้ดี ขณะที่เอนไซม์สกัดจากไอโซเลท ID2R1P2 ย่อยฟาง  
ข้าวได้ดี เอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจากทั้งสองไอโซเลทสามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงและ  
เป็นด่าง น่าจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมที่ใช้ความร้อนและด่างในขบวนการผลิตได้ เช่น  
การทำเยื่อกระดาษ การฟอกย้อมผ้า เป็นต้น

**คำสำคัญ :** แบคทีเรียจากกระเพาะหมัก, เซลลูเลส, ไซแลนเนส, วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

**Research Title:** Degradation of Agricultural Residues by Enzymes from Bacteria in Buffalo Rumen

**Researcher:** Asst.Prof. Kanya Jirajaroenrat, Assoc.Prof. Kan Suksupath, Assoc.Prof. Chamroon Laosinwattana, Asst.Prof. Kanokrat Srikijkasemwat

**Faculty:** Agricultural Technology

**Department:** Animal Production Technology and Fisheries

## ABSTRACT

This research was performed to isolate ruminal bacteria producing both cellulase and xylanase and to investigate the degradation of agricultural residues by the enzymes. Bacterial isolates ID2R1P1 and ID2R1P2 showed halo clear zones on both CMC agar and xylanase agar were selected for study. The 16S rDNA sequencing indicated that the ID2R1P1 and ID2R1P2 shared identity to *Corynebacterium* sp. (X89778.1) 99% and *Bacillus pumilus* 96% respectively. Isolate ID2R1P1 produced cellulase when incubation in CMC broth containing 1% CMC and 0.1% yeast extract at 39°C, pH 7.0 for 2 days and produced xylanase when incubation in xylan broth containing 2% xylan and 0.1% yeast extract at 37°C, pH 3.0 for 2 days. Optimal condition of cellulase activity was incubation at 50°C, pH 7.0 for 10 mins and for xylanase activity was incubation at 50°C, pH 7.0 for 10 mins. The crude enzyme was able to digest avicel and filter paper. Whereas, isolate ID2R1P2 produced cellulase when incubation in CMC broth containing 3% CMC and 0.1% yeast extract at 37°C, pH 5.0 for 5 days and produced xylanase when incubation in xylan broth containing 1% xylan and 0.1% yeast extract at 39°C, pH 4.0 for 3 days. Optimal condition of cellulase activity was incubation at 50°C, pH 5.0 for 10 mins and that of xylanase activity was incubation at 70°C, pH 8.0 for 10 mins. The crude enzyme was able to digest filter paper but not avicel. Sugarcane leaves could be used as carbon source for cellulase production while corn stalk and rice straw could be used as for xylanase production. Pretreatment of rice straw by microwaving for 30 mins and pretreatment of sugarcane leaves and corn stalk by autoclaving for 20 mins, then digesting by the crude enzymes showed that the enzyme from isolate ID2R1P1 could digest sugarcane leaves and corn stalk while the crude enzyme from isolate ID2R1P2 could digest rice straw. The xylanase activities of the two isolates presented at high level when incubation at high temperature and pH. This indicated that the enzymes could be applied to paper pulp production and textile bio-polishing process.

**Keywords :** ruminal bacteria, cellulase, xylanase, agricultural residues

### กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุนเงินรายได้คณะเทคโนโลยีการเกษตร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ คุณจรรยา คงฤทธิ์ นักวิทยาศาสตร์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร ในการให้คำปรึกษาในการวิเคราะห์เนื้อหาของวัตถุเหลือทิ้งทางการเกษตร คุณอำพล กล่อมปัญญา นักวิชาการสัตวบาลประจำภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร ในการที่ให้การช่วยเหลือการเตรียมวัตถุเหลือทิ้งทางการเกษตร

การวิจัยครั้งนี้ยังเป็นส่วนหนึ่งในการศึกษาของ นางสาวจุฑาทิพย์ เฉลิมวานิชวงศ์ และนางสาวทิภาภรณ์ งามสง่านักศึกษาระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณบุคลากรของคณะเทคโนโลยีการเกษตรทุกท่านที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยครั้งนี้ประสบผลสำเร็จบรรลุตามวัตถุประสงค์ได้ด้วยดีมา ณ ที่นี้

ผศ.ดร. กัญญา จิระเจริญรัตน์

รศ.ดร. กานต์ สุขสุแพทย์

รศ.ดร. จำรูญ เล้าสินวัฒนา

ผศ.ดร. กนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์

## สารบัญ

|                                                                                          | หน้า |
|------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย.....                                                                     | I    |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....                                                                  | II   |
| กิตติกรรมประกาศ.....                                                                     | III  |
| สารบัญ.....                                                                              | IV   |
| สารบัญตาราง.....                                                                         | VI   |
| สารบัญภาพ.....                                                                           | VII  |
| บทที่ 1 บทนำ.....                                                                        | 1    |
| 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....                                                  | 1    |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....                                                         | 1    |
| 1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....                                                               | 1    |
| 1.4 วิธีดำเนินการวิจัย.....                                                              | 2    |
| 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....                                                       | 2    |
| บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....                                                               | 3    |
| 2.1 ชีวมวล.....                                                                          | 3    |
| 2.2 วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร.....                                                       | 3    |
| 2.3 องค์ประกอบเยื่อใยของเซลล์พืช.....                                                    | 5    |
| 2.4 การปรับสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร.....                                            | 6    |
| 2.5 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส.....                                  | 10   |
| 2.6 ประชากรแบคทีเรียในกระเพาะหมักของสัตว์เคี้ยวเอื้อง.....                               | 11   |
| 2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....                                                           | 12   |
| บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....                                                          | 13   |
| 3.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากกระเพาะหมักของกระบือ.....                                  | 15   |
| 3.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสและไซแลนบนอาหาร<br>แข็ง..... | 15   |
| 3.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรีย.....                                | 16   |
| 3.4 การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์.....                                         | 18   |
| 3.5 การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์.....                                                  | 19   |
| 3.6 การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการทำกิจกรรมของเอนไซม์.....                                 | 20   |
| 3.7 การวิเคราะห์การย่อยสลายสับสเตรทของเอนไซม์.....                                       | 21   |
| 3.8 การเตรียมวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร.....                                              | 21   |
| 3.9 การทดสอบการปรับสภาพวัสดุที่เหมาะสม.....                                              | 21   |
| 3.10 การวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใยของวัสดุ.....                                              | 22   |
| 3.11 การประเมินการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร.....                                     | 22   |
| บทที่ 4 ผลการวิจัย.....                                                                  | 23   |

|                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| 4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนส | 23 |
| 4.2 ข้อมูลลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรีย                  | 23 |
| 4.3 สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์                            | 24 |
| 4.3.1 ผลของอุณหภูมิการบ่มเชื้อ                                  | 24 |
| 4.3.2 ผลของความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ                   | 24 |
| 4.3.3 ผลของปริมาณแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ                 | 25 |
| 4.3.4 ผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ                  | 26 |
| 4.3.5 ผลของระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ                             | 26 |
| 4.3.6 ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์            | 27 |
| 4.4 สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์สกัด                     | 27 |
| 4.4.1 ผลของระยะเวลาต่อการทำงานของเอนไซม์                        | 27 |
| 4.4.2 ผลของความเป็นกรดต่างต่อการทำงานของเอนไซม์                 | 28 |
| 4.4.3 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์                        | 28 |
| 4.5 ประสิทธิภาพการย่อยสลายสับสเตรทของเอนไซม์                    | 33 |
| 4.6 ผลการปรับสภาพเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร                   | 33 |
| 4.6.1 วิธีปรับสภาพด้วย microwave                                | 33 |
| 4.6.2 วิธีปรับสภาพด้วย autoclave                                | 34 |
| 4.7 ประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร     | 34 |
| <b>บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ</b>                              | 36 |
| <b>เอกสารอ้างอิง</b>                                            | 38 |
| <b>ภาคผนวก</b>                                                  | 43 |
| ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย                  | 44 |
| ภาคผนวก ข การวิเคราะห์เอนไซม์                                   | 49 |
| <b>ประวัตินักวิจัย</b>                                          | 52 |
| <b>ผลผลิตจากการวิจัย</b>                                        | 69 |

## สารบัญตาราง

| ตารางที่                                                                                                                                              | หน้า        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| ตารางที่ 2.1 ชนิดและปริมาณของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรของประเทศไทย.....                                                                               | 4           |
| ตารางที่ 4.1 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA จากไอโซเลท ID2R1P1 และ ID2R1P2<br>กับฐานข้อมูลGenBank.....                                       | 23          |
| ตารางที่ 4.2 ผลของอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ของไอโซเลท ID2R1P1 และ<br>ID2R1P2.....                                                  | 24          |
| ตารางที่ 4.3 ผลของค่าความเป็นกรดต่างในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ของไอโซเลท ID2R1P1<br>และ ID2R1P2.....                                         | 25          |
| ตารางที่ 4.4 ผลของปริมาณคาร์บอนซึ่เมธิลเซลลูโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ของไอโซ<br>เลท ID2R1P1.....                                         | 25          |
| ตารางที่ 4.5 ผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ของไอโซเลท ID2R1P1<br>และ ID2R1P2.....                                          | 26          |
| ตารางที่ 4.6 ผลของระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ของไอโซเลท ID2R1P1 และ<br>ID2R1P2.....                                                     | 26          |
| ตารางที่ 4.7 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสของไอโซเลท ID2R1P1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว<br>ที่ใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอน.....       | 27          |
| ตารางที่ 4.8 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสของเชื้อ ID2R1P1 และ ID2R1P2 เมื่อ<br>ทำปฏิกิริยาในระยะเวลาที่ต่างกัน.....                        | 28          |
| ตารางที่ 4.9 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสของเชื้อ ID2R1P1 และ ID2R1P2 เมื่อ<br>ทำปฏิกิริยาในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่างต่างกัน.....    | 29          |
| ตารางที่ 4.10 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสของเชื้อ ID2R1P1 และ ID2R1P2 เมื่อ<br>บ่มในอุณหภูมิที่ต่างกัน.....                               | 29          |
| ตารางที่ 4.11 ความสามารถต่อการย่อยสับสเตรทของเอนไซม์ ID2R1P1 และ ID2R1P2.....                                                                         | 33          |
| ตารางที่ 4.12 การปรับสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยวิธี microwave.....                                                                             | 34          |
| ตารางที่ 4.13 การปรับสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยวิธี autoclave.....                                                                             | 34          |
| ตารางที่ 4.14 ประสิทธิภาพการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรของเอนไซม์ ID2R1P1 และ<br>ID2R1P2.....                                                       | 35          |
| ตารางที่ 5.1 สรุปลักษณะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์และคุณสมบัติการทำงานของเอนไซม์เซลลู<br>เลสและไซแลนเนส จากเชื้อแบคทีเรียไอเลทID2R1P1 และ ID2R1P2..... | 36          |
| <b>ตารางภาคผนวกที่</b>                                                                                                                                | <b>หน้า</b> |
| ตารางผนวกที่ ข1 ค่ามาตรฐานกลูโคส.....                                                                                                                 | 49          |
| ตารางผนวกที่ ข2 ค่ามาตรฐานไซโลส.....                                                                                                                  | 50          |
| ตารางผนวกที่ ข3 ค่ามาตรฐานโปรตีน.....                                                                                                                 | 51          |

## สารบัญภาพ

| ภาพที่                                                                                                                    | หน้า |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ภาพที่ 4.1 ค่าฤทธิ์สัมพันธ์ของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (a) และไซแลนเนส (b) ในช่วงระยะเวลาของการบ่มที่แตกต่างกัน.....        | 30   |
| ภาพที่ 4.2 ค่าฤทธิ์สัมพันธ์ของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (a) และไซแลนเนส (b) ในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่างที่ต่างกัน..... | 31   |
| ภาพที่ 4.3 ค่าฤทธิ์สัมพันธ์ของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (a) และไซแลนเนส (b) ในอุณหภูมิของการบ่มที่แตกต่างกัน.....            | 32   |
| <br>                                                                                                                      |      |
| ภาพผนวกที่                                                                                                                | หน้า |
| ภาพผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานกลูโคส.....                                                                                      | 49   |
| ภาพผนวกที่ ข2 กราฟมาตรฐานไซโลส.....                                                                                       | 50   |
| ภาพผนวกที่ ข3 กราฟมาตรฐานโปรตีน.....                                                                                      | 51   |

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ประชาชนส่วนใหญ่ประกอบอาชีพเกษตรกรรม โดยมีพื้นที่การเพาะปลูกพืชหลัก ได้แก่ ข้าว อ้อย มันสำปะหลัง และข้าวโพด รวมกว่า 90 ล้านไร่ (สำนักเศรษฐกิจการเกษตร, 2553) ซึ่งผลผลิตทางการเกษตรในแต่ละอย่างนั้นจะสร้างรายได้ให้ประเทศได้เป็นจำนวนมาก ในแต่ละปีจะมีวัสดุเหลือทิ้งประมาณ 35 ล้านตัน (หักส่วนที่ถูกนำไปใช้ประโยชน์อย่างอื่น) (สำนักงานคณะกรรมการนโยบายพลังงานแห่งชาติ, 2542) แต่ก็มีบางส่วนที่จะสามารถสร้างมลพิษให้กับประเทศได้ เช่น เศษวัสดุทางการเกษตรต่างๆ ที่มีการทิ้งโดยเปล่าประโยชน์มากมาย เนื่องจากพืชผลทางการเกษตรต่างๆ เหล่านี้ได้มีการนำไปแปรรูปมากมาย จึงทำให้มีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเพิ่มจำนวนมากขึ้น นอกจากนี้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรซึ่งเป็นเศษพืชที่มีโครงสร้างทางเคมีเป็นสารจำพวกลิกโนเซลลูโลส ที่ทำให้ขั้นตอนกระบวนการย่อยหรือสลายพันธะค่อนข้างยากลำบากต่อระบบอุตสาหกรรม วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจึงเป็นปัญหาต่อการนำไปใช้ประโยชน์อย่างอื่น และก่อให้เกิดปัญหาต่างๆ เช่น มลภาวะทางสิ่งแวดล้อมต่างๆ ทั้งทางบกและทางน้ำ ปริมาณของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ได้จากการผลิตจากภาคเกษตรก็ยังมีปริมาณมากและเป็นภาระต่อการจัดการซึ่งส่งผลกระทบโดยตรงต่อภาคแรงงาน เศรษฐกิจ และสิ่งแวดล้อม การบริหารจัดการและเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหล่านี้ โดยการนำไปแปรรูปวัสดุหรือนำกลับไปใช้ประโยชน์ การพัฒนาวิจัยเพื่อเพิ่มมูลค่าวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจึงมีความสำคัญต่อความมั่นคงทางเศรษฐกิจของประเทศเป็นอย่างยิ่ง (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2552; สำนักบริหารจัดการกากอุตสาหกรรม, 2553) ปัจจุบันจึงได้มีการคิดค้นวิธีและเทคโนโลยีต่างๆ มากำจัดขยะทางการเกษตรอย่างมากมาย เพราะได้มีการศึกษากันอย่างต่อเนื่องถึงคุณสมบัติของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ที่พบว่าคุณลักษณะพิเศษของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมีรูปแบบของการสะสมพลังงานหรือกักเก็บพลังงานได้ จึงได้ค้นหาวิธีการทดลองและการปรับสภาพพืช เพื่อเอาความสามารถของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเหล่านี้มาใช้เป็นพลังงานทดแทน และผลิตเป็นพลังงาน โดยผ่านกระบวนการต่างๆ เพื่อนำมาให้เกิดประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมได้ การศึกษาวิธีการและเทคโนโลยีในการปรับสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเหล่านี้จะเป็นการช่วยลดต้นทุนการผลิตและลดปริมาณขยะที่เกิดจากผลผลิตทางการเกษตร ซึ่งเหลือจากการแปรรูปแล้วหรือยังไม่แปรรูปก็ตาม ซึ่งจะเป็นการลดมลภาวะของประเทศได้

#### 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 เพื่อประเมินสถานะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อการผลิตเอนไซม์
- 1.2.2 เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมและสถานะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์
- 1.2.3 เพื่อประเมินการปรับสภาพวัสดุที่เหมาะสมต่อวัสดุที่เลือกใช้
- 1.2.4 เพื่อประเมินความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

#### 1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

- 1.3.1 จัดหาตัวอย่างวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ ฟางข้าว ใบอ้อย และ ต้นข้าวโพด

- 1.3.2 วิเคราะห์ปริมาณเยื่อใยของวัสดุที่ใช้ก่อนทำการทดลอง
- 1.3.3 ประเมินวิธีการปรับสภาพวัสดุที่เหมาะสมกับตัวอย่างที่นำมาใช้ทดสอบโดยเปรียบเทียบเทคนิคการใช้ความดันไอน้ำและการใช้คลื่นไมโครเวฟ
- 1.3.4 คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากกระเพาะหมักของกระบือที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูโลสไลติกและและไซแลนโนไลติก
- 1.3.5 วิเคราะห์สายพันธุ์ของแบคทีเรียโดยใช้เทคนิคทางจุลชีววิทยาและชีวโมเลกุล
- 1.3.6 ประเมินสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ให้ปริมาณการผลิตเอนไซม์ที่สูงที่สุดโดยการทดสอบชนิดของแหล่งคาร์บอน ระดับความเข้มข้น และระยะเวลาของการบ่มเชื้อที่เหมาะสม
- 1.3.7 เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในสภาวะที่เหมาะสมและสกัดเอนไซม์รวมในรูปแบบ crude enzyme
- 1.3.8 ประเมินคุณสมบัติของเอนไซม์ ได้แก่ ความเข้มข้นของโปรตีนใน crude protein ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูโลสไลติกและไซแลนโนไลติก สภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ในการทำกิจกรรม
- 1.3.9 วิเคราะห์ปริมาณเยื่อใยของวัสดุที่ใช้หลังทำการทดลอง
- 1.3.10 วิเคราะห์ผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ก่อนและหลังการย่อยของเอนไซม์
- 1.3.11 รวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล รายงานผลการวิจัย

#### 1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

- 1.4.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่จะทดสอบ
- 1.4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรีย
- 1.4.3 การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนส
- 1.4.4 การประเมินวิธีการปรับสภาพวัสดุที่เหมาะสมกับตัวอย่างที่นำมาใช้ทดสอบ
- 1.4.5 การศึกษาการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยเอนไซม์

#### 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.5.1 ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากกระเพาะหมักของกระบือเพื่อให้ผลิตเอนไซม์ได้มากที่สุด
- 1.5.2 ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์
- 1.5.3 ทราบวิธีการปรับสภาพวัสดุที่เหมาะสมกับตัวอย่างที่นำมาใช้ทดสอบ
- 1.5.4 ทราบประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร
- 1.5.5 ใช้เป็นข้อมูลในการพิจารณาเลือกเอนไซม์สกัดที่เหมาะสมในการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรแต่ละชนิด

## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรม

#### 2.1 ชีวมวล

สารชีวมวลนั้นมีหลากหลายชนิดซึ่งมีองค์ประกอบต่างกัน องค์ประกอบขึ้นต้นได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน แป้ง และโปรตีน สารชีวมวลต่างชนิดกันย่อมมีองค์ประกอบต่างกัน ต้นไม้ นับเป็นชีวมวลที่ประกอบด้วย ลิกโนเซลลูโลส ประกอบด้วยเซลลูโลสและลิกนิน ต้นไม้มีจำนวนมากและมีศักยภาพมาก ชีวมวลแต่ละชนิดมีปริมาณขององค์ประกอบที่จะแตกต่างกัน เช่น ธัญพืชมีแป้งมาก ในขณะที่ของเสียจากปศุสัตว์มีโปรตีนมาก (Carere *et al.* 2008; Chandra *et al.* 2007)

#### 2.2 วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ในแต่ละปีจะมีปริมาณวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประมาณ 60 ล้านตัน โดยวัสดุที่เหลือทิ้งในปริมาณมากที่สุด ได้แก่ ฟางข้าว 25 ล้านตัน ยอดและใบอ้อย 13 ล้านตัน ต้นและใบข้าวโพด 3 ล้านตัน (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน 2552) ปริมาณเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ผลิตภายในประเทศจะแปรผันและขึ้นอยู่กับปริมาณผลผลิตทางการเกษตรของประเทศ วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรแต่ละชนิดมีองค์ประกอบทางเคมีและความชื้นแตกต่างกัน ชนิดและปริมาณของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรของประเทศไทย ดังตารางที่ 2.1

การนำไปใช้งานและแปรรูปขึ้นอยู่กับคุณภาพของวัสดุแต่ละชนิด (มูลนิธิพลังงานเพื่อสิ่งแวดล้อม, 2008) ดังนี้

##### 2.2.1 ฟางข้าว

ฟางเป็นลำต้นที่เหลือทิ้งหลังจากการเกี่ยวข้าว มีประโยชน์หลายอย่าง เช่น เป็นอาหารสัตว์ คลุมดิน เพาะเห็ดฟาง ทำโครงพวงหรีดดอกไม้ และใช้ในอุตสาหกรรมทำกระดาษ เป็นต้น แต่ยังมีฟางข้าวอีกมากที่ไม่ได้นำไปใช้ คาดว่าประมาณ 1 ใน 3 ของส่วนที่เหลือถูกเผาทิ้ง

##### 2.2.2 แกลบ

แกลบเป็นเปลือกที่ห่อหุ้มเมล็ดข้าวที่ได้หลังจากการสีข้าว ถูกนำมาเป็นวัสดุเชื้อเพลิงตามบ้านเรือน รวมทั้งเชื้อเพลิงสำหรับผลิตไฟฟ้าเพื่อจ่ายเข้าระบบ แต่การผลิตไฟฟ้าด้วยเชื้อเพลิงแกลบยังมีอุปสรรคในเรื่องการลงทุนค่าก่อสร้างโรงไฟฟ้า และความต้องการวัสดุเชื้อเพลิงในปริมาณที่มากเพียงพอและต่อเนื่อง กำลังการผลิตไฟฟ้า 1 เมกะวัตต์ ต้องใช้เชื้อเพลิงปีละ 10,000 ถึง 15,000 ตัน

##### 2.2.3 กากอ้อย

ส่วนของลำต้นอ้อยที่ผ่านขั้นตอนการคั้นน้ำออก ส่วนที่เป็นน้ำนำไปผลิตเป็นน้ำตาลดิบ ส่วนที่เหลือคือกากอ้อย ในปัจจุบันมีโรงงานน้ำตาลอยู่ประมาณ 46 โรง ส่วนใหญ่ใช้เป็นเชื้อเพลิงเพื่อผลิตน้ำตาลดิบประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลืออีก 20 เปอร์เซ็นต์ นำไปเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตกระดาษ และ Medium density fiber board (MDF)

##### 2.2.4 ใบอ้อยและยอดอ้อย

มีลักษณะเรียวยาว จะถูกตัดออกจากลำต้นอ้อยก่อนส่งไปโรงงาน ช่วงเดือนธันวาคมถึงเมษายน ดังนั้น ใบอ้อยและยอดอ้อยจะกระจายไปทั่วไร่อ้อย แต่บางครั้งชาวไร่อ้อยจะใช้วิธีการเผาแทนการตัด ซึ่งจะทำให้ไม่มีใบอ้อยและยอดอ้อยหลงเหลืออยู่ยอดอ้อยสามารถนำมาเป็นอาหารสัตว์ ใบอ้อยและยอดอ้อยส่วนใหญ่จะถูกเผาทิ้งในไร่ ยังไม่มีการนำไปใช้ประโยชน์

ตารางที่ 2.1 ชนิดและปริมาณของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรของประเทศไทย

| ชนิด        | ผลผลิต (ตัน) | ประเภทวัสดุ   | ปริมาณเหลือใช้ (ตัน) |
|-------------|--------------|---------------|----------------------|
| อ้อย        | 66,816,446   | ชานอ้อย       | 4,190,794.31         |
|             |              | ยอดและใบ      | 13,439,727.21        |
| ข้าว        | 31,508,364   | แกลบ          | 3,510,598.90         |
|             |              | ฟางข้าว       | 25,646,547.96        |
| ถั่วเหลือง  | 190,480      | ต้น/เปลือก/ใบ | 170,383.17           |
| ข้าวโพด     | 4,616,119    | ซัง           | 584,539.15           |
|             |              | ลำต้น         | 2,758,777.36         |
| ปาล์มน้ำมัน | 8,162,379    | ทะลายเปล่า    | 1,024,868.34         |
|             |              | ใบ            | 162,970.06           |
|             |              | กะลา          | 38,959.04            |
|             |              | ก้าน          | 2,203,740            |
| มันสำปะหลัง | 30,088,025   | ลำต้น         | 2,439,236.19         |
|             |              | เหง้า         | 1,834,466.88         |
| มะพร้าว     | 1,380,980    | ก้าน          | 628,990.82           |
|             |              | กาบ           | 464,250.95           |
|             |              | กะลา          | 128,936.58           |
| รวม         | 145,853,073  |               | 59,539,905.20        |

### 2.2.5 เหมันสำปะหลัง

เหมันเป็นส่วนที่ถูกตัดออกจากหัวมัน ด้านบนมีลักษณะเป็นลำต้นค่อนข้างกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางไม่เกิน 15 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 30 เซนติเมตร ส่วนอีกด้านหนึ่งมีรูปร่างไม่แน่นอน ปัจจุบันยังไม่ค่อยนำไปใช้งาน จึงมักถูกเผาทิ้งตามไร่ ความชื้นโดยเฉลี่ย 60 เปอร์เซ็นต์ และมีขนาดรูปร่างไม่แน่นอน จึงต้องมีกระบวนการทำให้เล็กลง ก่อนนำไปเป็นเชื้อเพลิง

### 2.2.6 เปลือกและกากมันสำปะหลัง

เปลือกมีลักษณะเป็นขุย สีน้ำตาล ความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์ กากมันมีลักษณะละเอียด สีขาว ความชื้นสูงประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ เป็นเศษที่เหลือจากการผลิตแป้งมันสำปะหลัง กากมันนำไปใช้ผสมอาหารสัตว์ในมันเส้น เปลือกมันทำปุ๋ย เนื่องจากเปลือกมันบางส่วนขายไม่ได้ ทางโรงงานแป้งมันจะนำไปฝังกลบ เพราะยังไม่ได้ศึกษานำไปใช้ให้เป็นประโยชน์อย่างอื่น

### 2.2.7 กากปาล์ม

กากปาล์มเป็นเศษเหลือจากการสกัดน้ำมันปาล์มดิบจากทะลายปาล์มสด มี 3 ส่วน คือ ไฟเบอร์มีลักษณะเป็นขุย กะลาคล้ายกะลามะพร้าวแต่มีขนาดเล็กกว่ามาก และทะลายปาล์มเปล่า อย่างไรก็ตามยังโรงงานสกัดอีกประเภทหนึ่งคือ นำเฉพาะผลปาล์มสดไม่รวมทะลายมาสกัด เศษที่ได้จะนำมาเป็นอาหารสัตว์ ไฟเบอร์นำมาเป็นเชื้อเพลิงในกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มดิบ จึงมีเหลือไม่มาก ทะลายเปล่านำไปเพาะเห็ด

### 2.2.8 ซังข้าวโพด และ ลำต้น

ซังข้าวโพดได้จากการสีข้าวโพดเพื่อนำเมล็ดมาใช้งาน ส่วนใหญ่เป็นข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ในส่วนของลำต้นจะถูกตัดหลังจากการเก็บเกี่ยวแล้ว ซังข้าวโพดนำไปเป็นวัตถุดิบผลิตแอลกอฮอล์ ใช้เป็นเชื้อเพลิง ใช้ผสมกับโม

ลาสเพื่อเลี้ยงสัตว์ ส่วนลำต้นข้าวโพดใช้นำไปเลี้ยงสัตว์ได้เช่นกัน ลำต้นข้าวโพดมีส่วนหนึ่งที่ไม่ได้นำไปใช้งาน ข้าวโพดจะไถฟางกลบในไร่

## 2.3 องค์ประกอบเยื่อใยของเซลล์พืช

เซลล์พืชประกอบด้วยโพลิเมอร์องค์ประกอบหลัก 3 ชนิด ได้แก่ เซลลูโลส 44เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 30เปอร์เซ็นต์ และลิกนิน 26เปอร์เซ็นต์ โดยเฉลี่ยในน้ำหนักแห้ง (U.S. DOE., 2006)

### 2.3.1 เซลลูโลส

เซลลูโลสเป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ -1,4-glycosidic โดยไม่มีการแตกกิ่ง ต่อเรียงกันประมาณ 100 – 14,000 หน่วยย่อย มีสูตรโมเลกุลเป็น  $(C_6H_{12}O_6)_n$  โดย  $n$  คือดีกรีของโพลิเมอร์ไรเซชัน เส้นใยเซลลูโลสจะจัดเรียงตัวกันเป็นไมโครไฟบริลและยึดโครงสร้างกันด้วยพันธะไฮโดรเจนโดยมีทั้งบริเวณที่การจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ เรียกว่า crystalline และไม่เป็นระเบียบ เรียกว่า amorphous การย่อยสลายโครงสร้างเซลลูโลสจำเป็นต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ endoglucanases (1,4- $\beta$ -D-glucan glucano-hydrolase, EC 3.2.1.4) และ exoglucanases (1,4- $\beta$ -D-glucan cellobiohydrolase, EC 3.2.1.91) ซึ่งจะให้ผลผลิตเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ cellobiose และสุดท้ายทำการย่อยด้วยเอนไซม์  $\beta$ -glucosidase (Beguin and Aubert, 1994)

### 2.3.2 เฮมิเซลลูโลส

เฮมิเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีมากเป็นอันดับรองจากเซลลูโลส เป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลเพนโตส หรือน้ำตาลเฮกโซส ได้แก่ กลูแคน (glucan) แมนแนน (mannan) และไซแลน (xylan) โดยมีไซแลนเป็นองค์ประกอบหลัก มีจำนวนยูนิตคาร์บอนเท่ากับ 5 โมโนแซคคาไรด์รวมถึง ดีไซโลสและดีอะราไบโนส และคาร์บอนเท่ากับ 6 โมโนแซคคาไรด์รวมถึง ดีแมนโนส ดีกาแลคโตสและดีกลูโคส โมโนแซคคาไรด์ที่มีคาร์บอนเท่ากับ 5 มีจำนวนมากกว่า โมโนแซคคาไรด์ที่มีคาร์บอนเท่ากับ 6 สูตรโมเลกุลโดยเฉลี่ย คือ  $(C_5 H_8 O_4)_n$  เนื่องจากดีกรีโพลิเมอร์ไรเซชันของเฮมิเซลลูโลสเท่ากับ 50-200 โดยมีขนาดเล็กกว่าเซลลูโลส จึงสามารถสลายพันธะได้ง่ายกว่าเซลลูโลส และ เฮมิเซลลูโลสเป็นจำนวนมากสามารถละลายได้ในสารละลายเบส เฮมิเซลลูโลสทั่วไปคือไซแลน ซึ่งประกอบด้วยไซโลสด้วยพันธะ 1,4- $\beta$ -D-xylopyranose (Chandra *et al.* 2007)

ไซแลนซึ่งเป็นโพลิเมอร์หลักของเฮมิเซลลูโลส มีโครงสร้างประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ -1,4-glycosidic bond โดยมี xylopyranose เป็นสายหลักและมีสารประกอบอื่นๆมาเกาะเป็นสายโซ่ข้าง เช่น หมู่อะราบินอซิล (arabinosyl) กลูคูโรนิล (glucoronyl) หรืออะซิติก (acetyl) การย่อยสลายไซแลนที่สมบูรณ์ต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์หลายชนิด ได้แก่ endoxylanase (1,4- $\beta$ -D-xylan- xylanohydrolase, EC 3.2.1.8) ในการย่อยสลายพันธะ 1,4- $\beta$ -D-xylan xylopic แบบสุ่มได้ไซโลสและโอลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้นๆเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย เอนไซม์ exo- $\beta$ -1,4-xylanases (1,4- $\alpha$ -D-xylan xylohydrolase) และ  $\beta$ -xylodidase (1,4- $\beta$ -D-cxylan-xylanohydrolase (EC 3.2.1.37) ในการย่อยสลายพันธะของ 1,4- $\beta$ -D-xylan-xylopyranose ที่ละหน่วยจากปลายด้านนอกได้น้ำตาลไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Dekker and Richard. 1976)การย่อยหมู่ย่อยบนสายโซ่อาศัยการทำงานของเอนไซม์  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) และ  $\alpha$ -D-glucuronidases (EC 3.2.1) (Beguin and Aubert, 1994).

นอกจากไซแลนแล้วในโครงสร้างเฮมิเซลลูโลสก็ยังคงประกอบด้วยโพลิเมอร์ของกาแลคโตแมนแนน galactoglucomannan และกลูโคแมนแนน glucomannan โดยกาแลคโตแมนแนนเป็นโครงสร้างที่ประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนสและกลูโคสต่อเชื่อมกันด้วยพันธะ  $\beta$ -1,4-glycosidic bond และมีน้ำตาลกาแลคโตสและหมู่อะวิติลเป็นสายโซ่ข้าง เอนไซม์ที่เข้ามาย่อยพันธะตรง  $\beta$ -mannan จะทำงานร่วมกันหลายชนิด ได้แก่ endomannanase (endo-1,4- $\beta$ -D-mannan manohydrolase, EC 3.2.1.78) และ  $\beta$ -1,4-mannasidase ( $\beta$ -D-mannoside manohydrolase, EC 3.2.1.25) นอกจากนี้เอนไซม์  $\beta$ -glucosidase และ  $\alpha$ -galactosidase ก็มีส่วนในการย่อยสายโพลิเมอร์เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Coughlan and Hazlewood, 1993)

### 2.3.3 ลิกนิน

ลิกนินเป็นสารประกอบเชิงซ้อนประเภทโพลิฟีนอลิก (polyphenolic) ประกอบด้วยยูนิตฟีนิลโพรเพนและอนุพันธ์ ซึ่งเชื่อมกันเป็นสามมิติ เกาะกันเป็นกลุ่มใหญ่และห่อหุ้มเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเอาไว้ข้างใน ยากที่จะสลายโดยจุลชีพและสารเคมี นอกจากนั้นยังมีความแข็งแรงทางกลและการป้องกันร่วมกับ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินถูกพบในสารชีวมวลชนิดต่างๆและแหล่งคาร์บอนธรรมชาติจำนวนมากบนโลก (Hendricks and Zeeman, 2009) ลิกนินจะพบในไม้เนื้อแข็งมากกว่าไม้เนื้ออ่อน สัตว์จะไม่สามารถย่อยลิกนินได้ แต่เชื้อราและแบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ในการย่อยสลายลิกนิน เรียกว่า เอนไซม์ลิกนินเนส ligninase หรือ lignin peroxidase (EC 1.14.99) เอนไซม์ลิกนินเนสที่สกัดจากเชื้อราขาวสายพันธุ์ *Phanerochaete chrysosporium* สามารถย่อยลิกนินได้ดี ขณะที่เอนไซม์ manganese peroxidase, laccase และ cellobiose dehydrogenase พบว่าเกี่ยวข้องกับขบวนการย่อยลิกนินเช่นกัน (Lebo *et al.*, 2001)

อย่างไรก็ตาม ลิกนินเป็นส่วนประกอบของโครงสร้างซึ่งอาจเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสได้ ทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายเยื่อใยพืชด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสไม่ดีเท่าที่ควร และยังเป็นอุปสรรคต่อการนำโพลิเมอร์ไปใช้งานต่อ—การย่อยเยื่อใยพืชจึงจำเป็นต้องมีการย่อยลิกนินเสียก่อน

## 2.4 การปรับสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

ในการนำวัสดุพืชไปใช้งานต้องผ่านขบวนการย่อยเสียก่อน การกำจัดสารประกอบพวกเฮมิเซลลูโลสและลิกนินออกจากโครงสร้างของวัสดุก่อนโดยการปรับสภาพวัสดุ (pre-treatment) จะช่วยปรับให้โครงสร้างของเซลลูโลสอยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาการย่อยด้วยเอนไซม์ (Ververis *et al.*, 2007) วิธีการปรับสภาพวัสดุสามารถทำได้หลายวิธี (Lynd *et al.*, 2002) อาทิเช่น การใช้สารเคมีประเภทกรดต่าง ได้แก่ กรดซัลฟูริก ( $H_2SO_4$ ) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) หรือ โซดาไฟ (lime) การใช้คลื่นไมโครเวฟ (microwave) การระเบิดด้วยแรงดันไอน้ำ (steam explosion) การระเบิดไฟเบอร์ในแอมโมเนีย (ammonia fiber explosion, AFEX) นอกจากนี้ยังมีการใช้รังสีแกมมา (Gamma ray) (ขวัญชนก จันทรสว่าง, 2544; วาสินี เทียงสุข, 2547; ชมพูนุช หาญนนทวิวัฒน์, 2547) ในการเพิ่มประสิทธิภาพการปรับสภาพวัสดุนิยมใช้สารเคมีร่วมกับเทคนิคทางกายภาพ เช่น การแช่วัสดุพืชในสารละลายต่าง NaOH แล้วนำมาต้มในเตาไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 600 – 900 วัตต์ (Rodrigues *et al.*, 2011) การแช่ฟางข้าวสาลีในกรดซัลฟูริก 0.08 N แล้วนำไประเบิดด้วยแรงดันไอน้ำที่ความดัน 18 บาร์

ก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยของเอนไซม์ (Tabka *et al.*, 2011) วิธีการปรับสภาพเบื้องต้นสามารถแบ่งออกเป็น 4 วิธี (Godliving, 2009) ได้แก่

#### 2.4.1 การปรับสภาพวัสดุโดยทางกายภาพ (Physical pretreatment)

เป็นการลดขนาดของวัตถุดิบ และทำให้เส้นใยเซลลูโลสแตกออก เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยามากขึ้น เช่น การบด และการใช้ความร้อนเป็นต้น ซึ่งการใช้ความร้อนเป็นการเพิ่มอุณหภูมิและการแผ่รังสีเป็นวิธีการทางกายภาพที่ประสบผลสำเร็จมากที่สุดวิธีหนึ่ง วิธีการที่เรียกว่า Thermogravimetric treatment โดยเพิ่มอุณหภูมิเป็น 826.85 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะทั้งที่มีก๊าซเฉื่อยและตัวออกซิแดนซ์สามารถทำให้เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินย่อยสลายได้ดี ส่วนวิธีการเผาแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Pyrolysis) พวกเปลือกถั่วชนิดต่างๆ ฟางข้าว หรือ พวกขี้เลื่อยที่อุณหภูมิ 326.85–926.85 องศาเซลเซียส ให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นพวกถ่าน ของเหลวและก๊าซมากกว่าวิธีธรรมดาทั่วไป 55 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการแผ่รังสีด้วยคลื่นไมโครเวฟที่ 700 W ด้วยเวลานานต่างๆ กัน พบว่ามีการสูญเสียน้ำหนักของวัตถุดิบไปบ้างเนื่องจากการสลายตัวของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน แต่ทำให้อัตราการย่อยสลายโดยใช้ต่างร่วมด้วยเพิ่มขึ้นมาก นอกจากนี้การใช้รังสีแกมมาขนาด 500 kGy ทำให้โครงสร้างของฟางข้าวสาเลที่ปั่นเป็นผงขนาด 140 mesh แตกตัวให้ผลผลิตน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้นอีก 13.40 เปอร์เซ็นต์

การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมี-ฟิสิกส์ (physicochemical pretreatment) เป็นการใช้วิธีทางกายภาพร่วมกับการใช้สารเคมี เช่น การใช้สารละลายเบสเจือจางและความร้อนภายใต้ความดันสูงในการปรับสภาพ ซึ่งประสิทธิภาพการย่อยสลายนั้น ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายเบสและความร้อนที่เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ แต่เมื่อใช้ความร้อนภายใต้สภาวะความดันสูงเพียงอย่างเดียว พบว่า อัตราการย่อยสลายสลายลดลง เมื่อความร้อนเพิ่มขึ้น เนื่องจากการแตกตัวของน้ำตาลที่เกิดขึ้น เปลี่ยนเป็นสารประเภทเพอร์ฟูรัล พอร์มัลดีไฮด์ หรือกรดฟอร์มิก เป็นต้น ซึ่งเป็นตัวขัดขวางขั้นตอนการย่อยสลาย

การย่อยสลายตัวอย่างด้วยไมโครเวฟเป็นหนึ่งในวิธีการของการนำเทคโนโลยีไมโครเวฟมาประยุกต์ใช้ในการเตรียมตัวอย่างที่นอกเหนือจากการทำให้เป็นเส้นใยหรือการสกัด ไมโครเวฟจะช่วยย่อยสลายสารที่มีความแข็งมากโดยการใช้ความร้อนที่ให้ประสิทธิภาพมากกว่าวิธีการให้ความร้อนแบบเดิมๆ โดยกลไกหลักในการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ คือ การเขย่าโมเลกุลให้สั่นภายใต้สนามแม่เหล็กหรือสนามไฟฟ้า อนุภาคเหล่านี้จะปรับตัวให้มีเฟสตรงกับสนาม แต่อย่างไรก็ตาม การเคลื่อนไหวของอนุภาคเหล่านี้จะถูกต้านด้วยแรงอันตรกิริยาระหว่างอนุภาคและแรงต้านไฟฟ้า ซึ่งจะทำให้อนุภาคเกิดการเคลื่อนที่แบบสุ่มจนเกิดเป็นความร้อน อีกทั้งนำมาใช้ในการอบแห้งด้วยคลื่นไมโครเวฟ เป็นเทคนิคการอบแห้งที่มักจะใช้ร่วมกับการพาคความร้อน แบบอื่นๆ (สมชาติ โสภณธฤทธิ์. 2540) การประยุกต์ใช้พลังงานไมโครเวฟในการอบแห้งมีประโยชน์หลายประการ ทั้งการร่นระยะเวลาการ อบแห้ง การกระจายพลังงานในเนื้อวัสดุเกิดขึ้นอย่างสม่ำเสมอ ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความสม่ำเสมอทั้งด้านความชื้น สี และคุณภาพลดการสูญเสียของส่วนประกอบที่ละลายน้ำในวัสดุ และช่วยในการ ประหยัดพลังงาน (ศิริประภา คลังทอง และ ศิริวิไล อนุกุลประชา. 2546)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการปรับสภาพด้วยวิธีใช้หม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูง (autoclave) เช่นการเตรียมไฮโดรไลสจากผักตบชวาโดยใช้หม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูงเพื่อผลิตเอทานอล พบว่าการใช้หม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูงร่วมกับการปรับสภาพทางเคมีเป็นวิธีการที่เหมาะสมวิธีหนึ่งซึ่งช่วยกำจัดลิกนินและไม่ทำให้

ปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสสูญเสียไป จากการศึกษารวบรวมของ พะวงศรีรัตน์ (2011) ที่ได้ทำการปรับปรุงสภาพผักตบชวาด้วยวิธีทางกายภาพร่วมกับทางเคมีและหม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูงพบว่าตัวอย่างผักตบชวาจากส่วนใบและลำต้นเริ่มต้นที่นำมาศึกษามีปริมาณเซลลูโลสมากที่สุดคือร้อยละ 44.71 ของน้ำหนักแห้ง ปริมาณเฮมิเซลลูโลสและปริมาณลิกนินคือร้อยละ 14.85 และ 3.06 ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ โดยสภาวะที่เหมาะสมในการปรับปรุงสภาพด้วยไฮโดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักร่วมกับหม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูงเป็นวิธีการปรับปรุงสภาพผักตบชวาที่ดีที่สุด ทำให้ได้เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสสูงถึงร้อยละ 47.38 และ 23.16 โดยน้ำหนักตามลำดับ และเหลือมีปริมาณลิกนินอยู่เพียงร้อยละ 3.71 โดยน้ำหนักและยังให้ลักษณะโครงสร้างทางกายภาพเหมาะสำหรับการนำไปใช้เป็นวัสดุตั้งต้นในการผลิตเอทานอล

#### 2.4.2 การปรับปรุงวัสดุโดยเคมี (Chemical pretreatment)

สารเคมี พวก oxidizing agents พวกกรดต่างๆ ไปจนกระทั่งถึงด่าง หรือเกลือสามารถย่อยสลายเซลลูโลสเฮมิเซลลูโลส และลิกนินได้และสามารถทำได้ภายใต้ความดันและอุณหภูมิปกติ

1) การใช้ด่าง (Alkaline treatment) ชนิดของสารละลายเบสเจือจางที่นิยมใช้กัน ได้แก่

ไฮดรอกไซด์ (NaOH) เป็นสารเคมีที่นิยมใช้มากที่สุด สามารถกำจัดลิกนินได้ดี เนื่องจาก NaOH เป็นเบสแก่ ซึ่งในบางครั้ง NaOH ไม่ได้กำจัดลิกนินออกไปเพียงอย่างเดียว แต่อาจทำลายเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสบางส่วนออกไปด้วย ดังนั้นการใช้ NaOH จึงจำเป็นต้องใช้อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมกับพืชชนิดนั้น ๆ ผลผลิตที่ได้จึงจะมีประสิทธิภาพมากที่สุด (Wang *et al*, 2010)

แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) เป็นสารเคมีที่นิยมใช้ไม่น้อยไปกว่า NaOH แต่เนื่องจาก  $\text{NH}_4\text{OH}$  เป็นเบสอ่อน จึงต้องใช้เวลาในการกำจัดลิกนินนานกว่าเล็กน้อย แต่ปัญหาที่พบจากการใช้  $\text{NH}_4\text{OH}$  คือ การกำจัดลิกนินออกไม่หมด และอาจมีกลิ่นของแก๊สแอมโมเนียที่เกิดจากกระบวนการย่อยสลายลิกนิน (Gupta and Lee, 2010)

ไฮไดรซัลไฟด์ ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) เป็นสารเคมีที่นิยมน้อยที่สุด แต่เป็นสารที่กำจัดลิกนินได้ดีที่สุด โดยที่  $\text{Na}_2\text{S}$  จะมีความจำเพาะเจาะจงกับลิกนินเท่านั้น โดยจะไม่มีผลต่อเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลส เหตุผลที่นิยมใช้  $\text{Na}_2\text{S}$  ค่อนข้างน้อย อาจเนื่องมาจากกลิ่นของแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่เกิดจากกระบวนการย่อยสลายลิกนิน แต่อย่างไรก็ตาม  $\text{Na}_2\text{S}$  ยังคงใช้ในระดับอุตสาหกรรมที่จำเป็นต้องกำจัดลิกนินออกเท่านั้น เช่น อุตสาหกรรมผลิตเยื่อ/กระดาษในหลายบริษัท เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ในการเลือกใช้สารเคมีดังกล่าวข้างต้น ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของพืชแต่ละชนิดที่นำมาใช้ โดยปัจจัยในการเลือกใช้สารเคมีอาจจะเลือกจากความแข็งของเนื้อไม้และคุณภาพในการแยกลิกนิน ดังนั้นกระบวนการปรับปรุงสภาพตัวอย่าง จึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการผลิตเซลลูโลสเอทานอล ทั้งในด้านคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์ (ประเวศ ตัญเต็มวงศ์ และคณะ. 2551)

2) การใช้กรด (Acid treatment ) เช่น sulphuric acid, hydrochloric acid, phosphoric acid

3) การใช้ก๊าซ (Gas treatment ) เช่น chlorine dioxide, nitrogen dioxide, sulphur dioxide

4) การเติมสารออกซิไดซ์ (Addition of oxidizing agents ) เช่น hydrogen peroxide, ozone

5) การสกัดลิกนินโดยสารละลาย (Solvent extraction of lignin ) เช่น ethanol-water extraction, benzene-water extraction, Ethylene glycol extraction, butanol-water extraction, swelling agents

#### 2.4.3 การปรับสภาพวัสดุโดยวิธีฟิสิกส์เคมี (Physicochemical pretreatment)

การรวมกันระหว่างวิธี chemical และ physical treatment มีส่วนสำคัญในการละลายน้ำของ เฮมิเซลลูโลส และลิกนินที่ถูกแปลงโครงสร้างแล้วเป็นผลทำให้การแตกตัวของเซลลูโลสในขั้นตอน hydrolysis เพิ่มขึ้นมีการใช้ Physicochemical pretreatment ร่วมกับ Thermochemical treatment เช่น วิธี steam explosion, ammonia fibre explosion, CO<sub>2</sub> explosion, SO<sub>2</sub> explosion เป็นต้น โดย Thermochemical treatment เป็นการแปรรูปชีวมวลให้เป็นพลังงานโดยใช้ความร้อนจนเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี เช่น การเผาไหม้โดยใช้ออกซิเจนหรือการสันดาป (combustion) การเผาไหม้โดยไม่ใช้ออกซิเจนหรือไพโรไลซิส (pyrolysis) และการทำให้เกิดก๊าซ (gasification) (Hertzmark, 1982)

Steam Explosion เป็นกระบวนการระเบิดด้วยไอน้ำเป็นกระบวนการที่ใช้ในการแยกองค์ประกอบที่สำคัญ 3 ชนิด ที่ประกอบอยู่ในพืชหรือในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรคือลิกนิน เซลลูโลส และ เฮมิเซลลูโลส ให้แยกออกจากกัน แล้วย่นำแต่ละองค์ประกอบไปใช้ประโยชน์ในการผลิตสารเคมีมูลค่าเพิ่มดังตัวอย่าง เช่น เฮมิเซลลูโลส ซึ่งมีน้ำตาลไซโลส เป็นองค์ประกอบหลักจะนำไปผลิตเป็นน้ำตาลไซลิทอล (xylitol) ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารลิกนิน ที่ได้จากการแยกด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำ ก็สามารถนำไปเป็นสว่นประกอบของสารเคมีในการผลิต กาวไม้ (wood adhesive) (Gravitis, 1998) และองค์ประกอบสุดท้ายคือ เซลลูโลสบริสุทธิ์จะนำไปผลิตพวกอนุพันธ์ของเซลลูโลส (cellulose derivative) เช่น คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC) เป็นต้น ฯลฯ ซึ่งนำไปใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ (Ibrahim, 1996) กระบวนการระเบิดด้วยไอน้ำมีหลักการว่าจะใช้ไอน้ำที่อุณหภูมิและความดันสูงโดยปกติ จะใช้อุณหภูมิในช่วงระหว่าง 180 - 210°C ระยะเวลาในการระเบิดนานไม่เกิน 10 นาทีซึ่งปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นคือ ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไอน้ำ โดยไอน้ำจะไปละลายส่วนของเฮมิเซลลูโลสออกมาส่วนขององค์ประกอบที่เหลือ คือ ลิกนินและเซลลูโลสจะนำไปแยกออกจากกันภายหลังโดยใช้สารละลายเบสที่สามารถละลายลิกนินได้แต่ไม่ละลายเซลลูโลส จากการทดลองของ Martinez *et al.* (1995) พบว่า สภาพของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส จะเกิดได้ดีขึ้นเมื่อมีการแช่ขาน้อยลงในสารละลายกรดอินทรีย์เจือจาง ก่อนจะทำการระเบิดด้วยไอน้ำ และระเบิดที่อุณหภูมิสูง แต่ช่วงระยะเวลาในการระเบิดสั้นไม่เกิน 4 นาทีเพราะการระเบิดที่อุณหภูมิสูงจะทำให้เฮมิเซลลูโลสละลายได้ดีขึ้น ในขณะเดียวกันการใส่ระยะเวลาในการระเบิดสั้นก็จะช่วยลดการแตกตัวของโมเลกุลของเซลลูโลสด้วย

#### 2.4.4 การปรับสภาพวัสดุโดยวิธีชีวภาพ (Biological pretreatment )

เป็นการปรับสภาพวัสดุที่ต้องพึ่งพาจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่เป็นแบคทีเรียและเชื้อรา รวมทั้งเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์เหล่านี้ เชื้อราทั้งชนิดที่เป็น white-rot, brown-rod และชนิดที่เป็น soft-rot สามารถย่อยสลายเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินได้ โดย brown-rod มีบทบาทสำคัญในการย่อยพวกเซลลูโลส ในขณะที่ white-rot และ soft-rot จะเข้าย่อยสลายพวกลิกนินและเฮมิเซลลูโลส จากการทดลองเมื่อไม่นานมานี้ เมื่อนำลิกโนเซลลูโลสมาหมักกับเชื้อราเหล่านี้ที่อุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-22 วันพบว่า เฮมิเซลลูโลส และ ลิกนิน ถูกย่อยสลายไปได้มากถึง 45-75 เปอร์เซ็นต์ และ 65-80 เปอร์เซ็นต์

ตามลำดับ นอกจากนั้นยังพบว่า เชื้อราที่ผ่านการ pretreatment ด้วยวิธีนี้ยังให้ก๊าซชีวภาพได้มากกว่า เมื่อนำไปต่อดัวยระบบ anaerobic digestion เชื้อราและแบคทีเรียเหล่านี้ได้แก่ *Aspergillus terreus*, *Trichoderma spp*, *Cyathus stercoreus*, *Penicillium camemberti*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Streptomyces griseus* ฯลฯ เป็นต้น

ในการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต้องใช้เอนไซม์หลายชนิด เนื่องจากเอนไซม์นั้นมีความจำเพาะเจาะจงในการทำปฏิกิริยาสูง เช่น เอนไซม์ endocellulase จะย่อยเซลลูโลสโครงสร้างผลึกให้เป็นเซลลูโลสสายโซ่ ส่วนเอนไซม์ exocellulase จะย่อยเซลลูโลสสายโซ่ให้เป็นเซลลูบิโนส และ  $\beta$ -glucosidase จะย่อยเซลลูบิโนสให้เป็นกลูโคส และขั้นตอนการทำปฏิกิริยาต้องอยู่ภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง ใช้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่ pH 5 โดยไม่เกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียง และไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งในอนาคต การย่อยสลายแบบนี้จะเป็นวิธีที่นิยมกันมาก เนื่องจากให้ปริมาณน้ำตาลที่สูง จึงเหมาะแก่การหมักเอทานอล (ประเวศ ตัญเต็มวงศ์ และคณะ 2551)

## 2.5 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส

### 2.5.1 เอนไซม์เซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลส

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลสที่สำคัญมี 2 กลุ่มคือ เอนไซม์ในกลุ่มเซลลูโลไลติก (cellulolytic) และไซลันโนไลติก (xylanolytic) โดยลักษณะการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองกลุ่มนี้จำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์หลายชนิดทำงานร่วมกัน (synergistic enzyme หรือ multipl enzyme) เซลลูเลสประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดทำหน้าที่ร่วมกันในการสลายเซลลูโลส จากการศึกษา ระบบเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งมีหลายองค์ประกอบในการทำปฏิกิริยาสามารถแบ่งเอนไซม์เซลลูเลสได้ 3 ชนิด โดยเรียกเอนไซม์ในกลุ่มนี้ว่า เซลลูโลไลติก (cellulolytic) (Fen and Lee, 1983)

เอนไซม์ที่สามารถย่อยเฮมิเซลลูเลสได้ เรียกว่า เฮมิเซลลูเลส (hemicellulase) ซึ่งมีหลายชนิด ได้แก่ ไซแลนเนส (xylanase) แมนนเนส (mannanase) และบีตา-กลูแคนเนส ( $\beta$ -glucanase) สารประกอบเฮมิเซลลูเลสที่มีในเนื้อไม้ส่วนใหญ่เป็นสารประกอบไซแลน ดังนั้น เอนไซม์ที่ย่อยสารเฮมิเซลลูเลสส่วนใหญ่จึงเป็นเอนไซม์ที่ย่อยไซแลนหรือเอนไซม์ไซแลนเนส ซึ่งสามารถจำแนกได้เป็นเอนไซม์ไซแลนเนส (Endo- $\beta$ -1,4 xylanase) มีหน้าที่ในการตัดพันธะเบต้า 1,4ไกลโคซิดิก (1,4-glycosidic) ภายในสายโซ่หลักของโมเลกุลไซแลนและเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดส ( $\beta$ -xylosidase) จะทำหน้าที่ในการย่อยไซโลไบโอส (xylobiose) หรือไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (xylooligosaccharide) ได้เป็นน้ำตาลไซโลส (Béguin and Aukert. 1994) นอกจากนี้ยังมีโครงสร้างเป็นกิ่งก้านสาขา และประกอบด้วยน้ำตาลหลายๆ ชนิด เอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายเฮมิเซลลูเลสมีหลายชนิด เช่น L-arabinanases, D-galactanases, D-mannanases และ D-xylanase ปริมาณของเอนไซม์เหล่านี้ขึ้นอยู่กับสปีชีส์ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ชนิดของจุลินทรีย์ และ สภาวะที่เลี้ยงเชื้อ (Reilly, 1980)

การย่อยสลายเซลลูโลส และเฮมิเซลลูเลส สามารถทำได้โดยวิธีการทางเคมีหรือการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ แต่การใช้เอนไซม์จะดีกว่าวิธีทางเคมีเนื่องจากการย่อยสลายโดยเอนไซม์มีความจำเพาะสูงกว่า และสภาวะที่ใช้ในการย่อยสลายไม่รุนแรงเท่ากัวิธีทางเคมี นอกจากนี้ไม่มีการสูญเสียน้ำตาลที่ได้ เหมือนกับการเขาทำปฏิกิริยากับสารเคมี (Wong et al.1988)

### 2.5.2 เอนไซม์ D-galactanases

D-galactanases เป็น hydrolytic enzyme ที่ผลิตจากแบคทีเรีย รา และพืช สามารถย่อยสลายได้ทั้ง D-galactan และ L-arabino-D-galactan D-galactanases มี 2 ชนิดคือ  $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-galactanases}$  ที่จำเพาะต่อ  $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-galactopyranosyl linkages}$  และ  $(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-D-galactanases}$  ที่จำเพาะต่อ  $(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-D-galactopyranosyl linkages}$

### 2.5.3 เอนไซม์ D-mannanases

D-mannanases ( $(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-D-mannan mannanohydrolases}$ , endo-D-mannanase, EC 3.2.1.78) เป็นเอนไซม์ซึ่งสามารถย่อยสลาย  $(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-D-mannanopyranosyl linked}$  ของ D-mannans, D-gluco-D-mannan และ D-galacto-D-mannans เอนไซม์ชนิดนี้ผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรีย, Rumen bacteria, Rumen protozoa, Mycorrhiza fungi, พืช และ สัตว์

### 2.5.4 เอนไซม์ D-xylanase

โดยทั่วไปเฮมิเซลลูโลสจะมีโครงสร้างหลักเป็นไซแลน โดยเฉพาะในไม้เนื้อแข็งและพืชตระกูลหญ้า ดังนั้นไซโลสจึงเป็นน้ำตาลที่มีมากที่สุดในกลุ่มเฮมิเซลลูโลส ซึ่งมีผลทำให้ D-xylanase เป็นเอนไซม์ที่มีปริมาณมากที่สุดในกลุ่มของเฮมิเซลลูเลสด้วย และในบางครั้งถือว่า D-xylanase หมายถึง เฮมิเซลลูเลส D-xylanase แบ่งออกเป็น 2 ชนิด ตามซับสเตรทที่เข้าไปย่อยสลายคือ  $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-xylanases}$  และ  $(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-D-xylanases}$

## 2.6 ประชากรแบคทีเรียในกระเพาะหมักของสัตว์เคี้ยวเอื้อง

สัตว์เคี้ยวเอื้องเป็นสัตว์กินพืชเป็นอาหารหลัก ในกระเพาะหมักของสัตว์เคี้ยวเอื้องจึงมีจุลินทรีย์อาศัยอยู่หลายชนิด คือ แบคทีเรีย โปรโตซัว และ เชื้อรา จุลินทรีย์เหล่านี้จะช่วยในการสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยเยื่อใยพืชเปลี่ยนเป็นโภชนะ แต่ชนิดและสัดส่วนของจุลินทรีย์อาจแปรผันไปได้ขึ้นอยู่กับอาหารที่สัตว์ได้รับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโภชนะประเภทที่เกิดการหมักย่อยได้ อย่างไรก็ตามในกระเพาะหมักของสัตว์เคี้ยวเอื้องนั้นมีจำนวนประชากรของแบคทีเรียมากที่สุด โดยในโคกระบือที่ปล่อยเลี้ยงตามธรรมชาติในชนบทของประเทศไทย พบจำนวนแบคทีเรียในกระเพาะหมักของกระบือ  $1.61\times 10^9$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ขณะที่ในโคมีแบคทีเรียอยู่  $1.36\times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Wanapat, 2001)

ในการศึกษาประชากรของแบคทีเรียในกระเพาะหมักของกระบือปลักในประเทศไทยด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลโดยการวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมของยีน 16S rRNA พบว่ามีความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียอยู่สูง โดยมีกลุ่มประชากรแบคทีเรีย Low G+C gram-positive bacteria มากที่สุดถึง 57.8 เปอร์เซ็นต์ และเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสและไซแลนเนสได้ นอกจากนี้ยังพบว่ามีแบคทีเรียชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยรายงานมาก่อนด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ (unculturable bacteria) อยู่ถึง 56.07 เปอร์เซ็นต์ (ศรัณยา สติธัยมันวิวัฒน์. 2551) แสดงได้กระเพาะเลี้ยงเชื้อจากกระเพาะหมักของกระบือในประเทศไทยสามารถค้นพบแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ๆได้

Kamra (2005) รายงานว่าสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ย่อยสลายเยื่อใยพืชได้ (fibrolytic bacteria) ในกระเพาะหมักของโคที่สามารถคัดแยกเชื้อได้โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ คือ กลุ่มแบคทีเรียที่ย่อยสลาย

เซลลูโลสได้ (Cellulolytic bacteria) ได้แก่ *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *R. albus*, *Clostridium cellobioparum*, *Cl. longisporum*, *Cl. lochheadii* และ *Eubacterium cellulosolvens* และ กลุ่มแบคทีเรียที่ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสได้ (Hemicellulolytic bacteria) ได้แก่ *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola* (*Bacteroides ruminicola*), *E. xylanophilum* และ *E. uniformis*

ระพีพรรณ อินปิ่นแก้ว (2530) คัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากของเหลวในกระเพาะหมักของโคพื้นเมืองของไทย โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งชนิด rumen fluid glucose cellobiose agar บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส ใน สภาวะไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 3 วัน โดยพบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นแกรมบวกรูปกลม และเมื่อแยกแบคทีเรียที่สลายเซลลูโลสโดยใช้ cellulose agar บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจนได้แบคทีเรียทั้งหมด 101 ไอโซเลท แล้วตรวจสอบความสามารถในการสลายเซลลูโลส โดยวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าแบคทีเรียจำนวน 31 ไอโซเลท มีความสามารถสลายเซลลูโลสได้สูง ในจำนวนนี้ 5 ไอโซเลท มีความสามารถสูงมาก เมื่อจำแนกสายพันธุ์พบว่าเป็น *R. flavefaciens* และ *R. albus* 21 Aa และเมื่อทดสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้ filter paper เป็นแหล่งคาร์บอนและ tryptone เป็นแหล่งไนโตรเจน และบ่มที่ pH 6.8 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบค่าการทำงานของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.0166 ยูนิต/มิลลิลิตร

Sewell et al (1988) สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียชนิดใหม่ได้ 6 ไอโซเลทที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไฮโดรเลสจากกระเพาะหมักของโค และเมื่อจัดจำแนกสายพันธุ์พบว่ามีความใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *Butyrivibrio fibrisolvens* และสามารถย่อยสลายไฮโดรเลสจากหญ้า Napier ได้

Oyeleke and Okusanmi (2008) สามารถทำการคัดแยกจุลินทรีย์จากกระเพาะหมักของ โค แกะ และแพะ ได้แบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas aeruginosa* 9.0 เปอร์เซ็นต์ *Bacillus sp.* 37.8 เปอร์เซ็นต์ *Micrococcus sp.* 8.1 เปอร์เซ็นต์ และ *Streptococcus sp.* 44.3 เปอร์เซ็นต์ โดยแบคทีเรียที่แยกได้มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้

## 2.7 การย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยเอนไซม์

Vintila et al. (2010) ได้ศึกษาการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยเอนไซม์กลุ่มเซลลูโลสไลติกและเฮมิเซลลูโลสไลติกโดยใช้เอนไซม์ที่สกัดจากเชื้อรากลุ่ม *Trichoderma reesei*, *T. viride* และ *Aspergillus niger* เป็นที่นิยมเนื่องจากปัจจุบันได้มีการผลิตขายในทางการค้า โดยเอนไซม์สกัดจากเชื้อรา *T. viride* สามารถย่อยเปลือกข้าวโพด ชานอ้อย และฟางข้าวสาลีหลังการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 เปอร์เซ็นต์ และอบที่แรงดันไอน้ำ 2 บาร์ นาน 30 นาที ให้เป็นผลผลิตน้ำตาลกลูโคส 200-800 มิลลิกรัมต่อกรัมของวัสดุ

เอนไซม์ที่สกัดจากเชื้อรา *T. reesei* ร่วมกับเอนไซม์จาก *A. niger* ย่อยฟางข้าวสาลีที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและระเบิดด้วยแรงดันไอน้ำให้เป็นน้ำตาลกลูโคสได้สูงสุด 49 มิลลิกรัมต่อวัสดุ (Tabka et al, 2006) สามารถย่อยฟางข้าวบาร์เลย์ให้เป็นน้ำตาลกลูโคสได้สูงสุด 7 กรัมต่อลิตร (Rosgaard et al, 2007) และย่อยผลมะม่วงหิมพานต์ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยคลื่นไมโครเวฟในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ได้น้ำตาลกลูโคสสูงสุด 15 กรัมต่อลิตร (Rodrigues et al, 2011)

วิมลทิพย์ ไตรปัญญา และคณะ (2550) อธิบายว่าเอนไซม์รวมที่สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรียมีการนำมาใช้ในการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้ดีเช่นการนำ *Bacillus sp.* สายพันธุ์ TW-1 ที่คัดแยกมา

จากถังหมักแก๊สชีวภาพ ซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์ไฮโดรแลนเนส 6.41 U/มิลลิกรัม protein กิจกรรมคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส 0.14 U/มิลลิกรัม protein และมีกิจกรรมอะราบินโนฟูราโนซิเดส เบต้าไซโลซิเดส และเบต้ากลูโคซิเดสเล็กน้อย พบว่าเอนไซม์รวมดังกล่าวสามารถย่อยเปลือกข้าวโพดได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ช้างข้าวโพด ชานอ้อย ฟางข้าว และแกลบ ตามลำดับ

กฤษมา แก้วอินทะจักร์ และคณะ (2549) พบว่าเอนไซม์สกัดรวมจากเชื้อ *Bacillus circulans* B-6 ซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์ไฮโดรแลนเนสและคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสามารถย่อยช้างข้าวโพดได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ชานอ้อย ฟางข้าว แกลบและรำข้าว ตามลำดับ โดยการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยเอนไซม์สกัดจากเชื้อทั้งสองชนิดให้ผลเป็นไซโลส กลูโคส เซลลูโบไอสและไซโลโบไอส

Ratanakhanokchai *et al* (1999) การย่อยเปลือกข้าวโพดด้วยเอนไซม์สกัดจากเชื้อ *B. firmus* K-1 สามารถย่อยเปลือกข้าวโพดได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลไซโลสเพียงอย่างเดียวเนื่องจากเชื้อชนิดนี้สร้างเฉพาะเอนไซม์กลุ่มไฮโดรแลนโนไลติก

พรวินา ทองมิตร และคณะ (2555) ได้ศึกษาการเพิ่มผลผลิตน้ำตาลจากชานอ้อยโดยนำชานอ้อยมาทำการกระเปิดด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 120 และ 180 องศาเซลเซียส ร่วมกับกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 6 ค่าตั้งแต่ร้อยละ 0–5 (กรัม/ปริมาตร) เป็นเวลาตั้งแต่ 5–10 นาที จากผลการทดลองพบว่าการย่อยสลายที่เหมาะสมคือ การกระเปิดด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส ร่วมกับกรดอะซิติกที่ความเข้มข้นร้อยละ 4 เป็นเวลา 5 นาที สามารถผลิตน้ำตาลรวมได้สูงเท่ากับ 16.91 กรัม/ลิตร การกระเปิดด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงสุด และที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียสได้ปริมาณน้ำตาลไซโลสได้สูงสุด

รัชพล พะวงศรีรัตน์ (2553) นำผักตบชวาส่วนที่เป็นของเหลวจากขบวนการปรับสภาพจำนวน 1 มิลลิลิตร ศึกษาองค์ประกอบของน้ำตาล และสารประกอบอนุพันธ์ พบว่า ในการปรับสภาพมีปริมาณน้ำตาล เช่น น้ำตาลไซโลส และน้ำตาลกลูโคส สารประกอบที่เป็นพิษ เช่น 5-HMF และ furfural ในปริมาณที่น้อยมาก ยกเว้นตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกจะให้ปริมาณน้ำตาลออกมาด้วย เนื่องจากกรดแก่จะมีความสามารถย่อยสลายสูง (hydrolysis) จึงทำให้เส้นใยถูกย่อยสลายต่อเนื่องจนได้น้ำตาลออกมา

เวสารัช สุนทรชัยบูรณ์ และคณะ (2555) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากใบตองในถังหมักแบบแพคเบดโดยเชื้อยีสต์ *Candida shehatae* TISTR 5843 ตรึงรูปบนช้างข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธี autoclave พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยใบตอง คือ กรดซัลฟูริก ร้อยละ 8 ได้น้ำตาลไซโลส และน้ำตาลกลูโคส เท่ากับ  $2.25 \pm 0.33$  และ  $1.17 \pm 0.18$  กรัม/ลิตร ตามลำดับ วิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของน้ำตาล ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลไซโลส ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) พบว่า อัตราการผลิตเอทานอลสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 1 คือ  $0.95 \pm 0.03$  กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ดังนั้นใบตองจึงเป็นอีกทางเลือกที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตเอทานอลโดยประยุกต์ใช้ร่วมกับถังหมักแบบแพคเบด

Keshwani และ Cheng (2009) ได้ศึกษา Switchgrass และ bermudagrass มาผลิตเป็นเอทานอล โดยต้องการปรับสภาพลิกนิน โดยใช้ไมโครเวฟปรับสภาพวัสดุ โดยการแช่วัสดุในสารละลายเจือจางต่างและผ่านรังสีไมโครเวฟที่ 250 วัตต์ ตั้งแต่ 5-20 นาที พบว่าโซดาไฟเป็นสารอัลคาไลน์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดสำหรับการปรับสภาพไมโครเวฟ ผลผลิตในการย่อย ของ Switchgrass ได้กลูโคส 82 เปอร์เซ็นต์

และ ไชโลส 63 เปอร์เซ็นต์ และ ผลผลิตในการย่อยในBermudagrass ของ กลูโคส 87 เปอร์เซ็นต์ และ  
ไชโลส 59 เปอร์เซ็นต์

### บทที่ 3

#### วิธีการดำเนินงาน

#### 3.1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากกระเพาะหมักของกระบือ

##### 3.1.1 การเก็บของเหลวจากกระเพาะหมัก

เก็บของเหลวจากกระเพาะหมักจากโรงฆ่าสัตว์ จากโรงฆ่าสัตว์หนองจอก กรุงเทพมหานคร กรองตัวอย่างผ่านผ้าขาวบาง 2 ชั้น ใส่ในขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (พรณทิพา ธงทอง, 2548) นำของเหลวที่ได้จากกระเพาะหมักเก็บในกระตักรักษาอุณหภูมิของเหลวให้คงเดิม

##### 3.1.2 การวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด

นำของเหลวจากกระเพาะหมักที่ได้มาทำการเจือจางอย่างเป็นลำดับขั้นด้วย peptone 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ตัวอย่างของเหลว 1 มิลลิลิตร มาถ่ายลงในสารละลาย peptone 9 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้น 10<sup>-1</sup> เจือจางต่อไปจนได้ความเจือจาง 10<sup>-6</sup> ดูดสารละลายที่ในแต่ละระดับความเจือจางมา 200 ไมโครลิตร และถ่ายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Rumen Fluid Glucose Cellobiose Agar (RFGCA) โดยใช้วิธี spread plate technique บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะไร้ออกซิเจนโดยบ่มเชื้อใน candle jar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาตรวจนับจำนวนเชื้อทั้งหมดบนจานเพาะเชื้อ โดยจะทำการนับจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีระหว่าง 30 - 300 โคโลนี

##### 3.1.3 การตรวจสอบลักษณะของเชื้อโดยกล้องจุลทรรศน์

นำเชื้อแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงในอาหาร Nutrient agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 48 ชั่วโมง ศึกษาการย้อมติดสีแกรม (gram stain) โดยศึกษารูปร่าง ลักษณะการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียตามวิธีที่ใช้ใน Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Krieg *et al*, 1984)

##### 3.1.4 การแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์

แยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี streak plate technique บนอาหาร RFGCA เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ (single colony) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน

#### 3.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสและไซลันบนอาหารแข็ง

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากกลบนอาหารเหลว nutrient broth บ่มที่อุณหภูมิห้องภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 nm เพื่อตรวจสอบปริมาณเชื้อเริ่มต้น แล้วปรับให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากัน เพื่อให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากันในทุกตัวอย่างและทดสอบกิจกรรมเอนไซม์โดยใช้วิธี agar spot (Nowroozi *et al*, 2004) โดยใช้ไมโครปิเปตดูดเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารทดสอบของแต่ละเอนไซม์จานละ 4 จุด ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเชื้อแห้ง เอนไซม์เซลลูเลส ใช้อาหารทดสอบคือ carboxymethyl cellulose agar (CMC agar) และเอนไซม์ไซลันเนสใช้อาหารทดสอบคือ xylan agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 72 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะไร้อากาศ ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเอนไซม์เซลลูเลสและไซลันเนส โดยการใช้สารละลายไอโอดีนเทให้ท่วมเชื้อเป็นเวลา 5 นาที จะปรากฏวงสีที่ไม่ติดสี

สารละลายไอโอดีนซึ่งเกิดจากการย่อยสลายไอโอดีน วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสและเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี เปรียบเทียบจานอาหารที่ไม่ได้เลี้ยงเชื้อ (negative control) จากนั้นคำนวณหาอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสต่อขนาดโคโลนี (Lu *et al.*, 2005) โดยใช้สูตร

$$\text{อัตราส่วนวงใสต่อโคโลนี (HC)} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางวงใสในรอบโคโลนี (cm)}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (cm)}}$$

### 3.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรีย

#### 3.3.1 การสกัดจีโนมดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย

สกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวลงในอาหารแข็ง LB agar ในสภาพไร้อากาศ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเลี้ยงเชื้อในอาหาร LB broth บ่มที่อุณหภูมิห้อง สภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตกตะกอนเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้งเหลือตะกอนเซลล์ เติม TE buffer 6.7 เปอร์เซ็นต์ sucrose ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปเขย่าเพื่อให้ตะกอนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติม lysozyme ความเข้มข้น 70 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม 20% SDS ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 15 นาที เติม proteinase K ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสประมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ใหม่ เติม phenol: chloroform: isoamyl (25:24:1) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที 15 นาที ดูดส่วนใสด้านบนสุดใสในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ใหม่ เติม isopropanol 1 เท่าของ DNA ที่ไว้อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 รอบต่อนาที 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง คว่ำบนกระดาษทิชชู ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที 10 นาที เทสารละลายทิ้งปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 50 ไมโครลิตร และนำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดหาปริมาณ และคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยเครื่อง spectrophotometer (Ultraspec 1100pro: Amersham Bioscience, UK) โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ( $A_{260}$ ) และ 280 นาโนเมตร ( $A_{280}$ ) สำหรับดีเอ็นเอและโปรตีนตามลำดับ โดยคุณภาพดีเอ็นเอพิจารณาจากค่า  $A_{260}/A_{280}$  เพื่อประเมินความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอเทียบกับโปรตีนที่ปนเปื้อนอยู่หลังจากการสกัดแยก ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูงจะมีค่า  $A_{260}/A_{280}$  เท่ากับ 1.8-2.0 เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

#### 3.3.2 การตรวจสอบจีโนมดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบความเข้มข้นในเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยเตรียม 0.8 กรัม agarose ละลายใน 1X TBE pH 8.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ด้วยความร้อน จากนั้นทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เทเจลลงในถาดเจล (gel chamber) ทิ้งให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับ 6X Loading dye ในอัตราส่วน 2:1 ใช้  $\lambda$ DNA (Fermentas, Canada) 100 นาโนกรัม เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานเมื่อเทียบขนาดดีเอ็นเอ ใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60

นาที่ ย้อมเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ตรวจแถบดีเอ็นเอผ่านเครื่อง gel documentation (Syngene genious; Bio Imaging System, USA)

### 3.3.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นยีนด้วยเทคนิคปฏิกิริยาอุณหภูมิสูงโพลีเมอเรส

ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย 16S rDNA จากดีเอ็นเอที่สกัดแยกได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับแบคทีเรีย (Kanokratana *et al*, 2004)

BSF8/20 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')

REVB (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')

เทคนิคพีซีอาร์ ปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ความเข้มข้น 0.5 นาโนกรัม สารละลาย 1X ViBuffer A (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9.1 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส), 0.1 เปอร์เซ็นต์ Triton<sup>TM</sup> X-100; Vivantis, MY), dNTP ความเข้มข้น 200  $\mu$ M MgCl<sub>2</sub> ความเข้มข้น 1.5 mM ไพร์เมอร์ในส่วนของ Forward (BSF8/20) และ Reverse (REVB) ความเข้มข้นอย่างละ 0.2  $\mu$ M ตามลำดับ เอนไซม์ Taq DNA polymerase (Vivantis, USA) ความเข้มข้น 0.005 ยูนิต และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จะใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ (MyCycler<sup>TM</sup> thermal cycler) โดยมีโปรแกรมการทำงานดังนี้ ก่อนการทำงานของปฏิกิริยาพีซีอาร์ กำหนดอุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาพีซีอาร์จำนวน 35 รอบ ตามวงรอบที่อุณหภูมิต่างๆ กันคือ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วินาที จากนั้นลดอุณหภูมิลงในช่วง 50 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นที่ระดับ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 45 วินาที เมื่อปฏิกิริยาทำงานครบ 36 รอบก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยาให้คงอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีจำนวน 1 รอบ ซึ่งถือได้ว่าขั้นตอนการทำปฏิกิริยาเสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์

### 3.3.4 การสกัดดีเอ็นเอจากเจลและทำให้บริสุทธิ์

ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์และตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตผ่านเครื่อง gel documentation เปรียบเทียบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการสังเคราะห์กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน สกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วย FarvorPrep<sup>TM</sup> GEL/PCR Purification kit (Favorgen, Austria) ตัดแถบแบนพีซีอาร์ที่ต้องการใส่ หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ เติมน้ำฟอสเฟต FADF 500 ไมโครลิตร ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจลที่ตัดได้ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลละลายหมด เปิดสารละลายดีเอ็นเอใส่ใน column tube ที่วางอยู่ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที 1 นาที เทส่วนใสทิ้งเติม wash buffer 800 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที 3 นาที ย้าย column ลงหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ ใหม่ ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เติมน้ำ elute buffer 40 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที 3 นาที ตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากผลผลิตพีซีอาร์โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีการตรวจสอบจีโนมิกดีเอ็นเอโดยใช้ 100 bp DNA Ladder เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

### 3.3.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA โดยติดฉลากฟลูออเรสเซนต์ BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit แล้วทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ABI3730XL (Applied Biosystem) ทำการวิเคราะห์โดยบริษัท First base ประเทศมาเลเซีย นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลยีน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tools)

## 3.4 การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

นำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงบน nutrient agar บ่มอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงใน nutrient broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm เพื่อตรวจสอบปริมาณเชื้อเริ่มต้น ศึกษาปัจจัยต่างที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ ดังนี้

### 3.4.1 อุณหภูมิการบ่มเชื้อที่เหมาะสม

เตรียมเชื้อตั้งต้น เลี้ยงในอาหารเหลว CMC broth และ xylan broth บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน คือ 33, 35, 37, 39 และ 41 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในสภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 230 รอบต่อนาที แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้ DNS reagent เพื่อหา enzyme activity

### 3.4.2 ค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสม

เตรียมเชื้อตั้งต้นเลี้ยงใน CMC broth และ xylan broth ปรับ pH ของอาหาร (pH 3.0-9.0) บ่มที่อุณหภูมิที่เชื่อให้ค่าการทำงานของเอนไซม์สูงสุด เป็นเวลา 7 วัน ในสภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 230 รอบต่อนาที วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้ DNS reagent เพื่อหา enzyme activity

### 3.4.3 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

เตรียมเชื้อตั้งต้นเลี้ยงใน CMC broth และ xylan broth ที่มีแหล่งคาร์บอนและ pH ที่เชื่อให้ค่าการทำงานของเอนไซม์สูงสุด โดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 3 ชนิด คือ yeast extract, urea และ tryptone ที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ในสภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 230 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้ DNS reagent เพื่อหา enzyme activity

### 3.4.4 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในสูตรอาหารเหลว Lubia-Bertani broth โดยใช้ฟางข้าว ชังข้าวโพด และชานอ้อย เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเตรียมแหล่งคาร์บอนด้วยการปั่นให้เล็กลงด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 40 mesh ล้างด้วยน้ำกลั่น กรองน้ำทิ้งแล้วอบแห้งที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง (วิมลทิพย์ ไตรปัญญา และคณะ. 2550) ผสมในอาหารที่ระดับความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (W/V) บ่มไว้ในตู้บ่มที่เขย่าในความเร็ว 230 รอบต่อนาที ตามสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมคือ เป็นเวลา 1-5 วัน แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกเก็บส่วนใส แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้ วิธี DNS method เพื่อหา enzyme activity

### 3.4.5 ระยะเวลาการบ่มที่เหมาะสม

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสม โดยเลือกความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน CMC 3 เปอร์เซ็นต์ และ xylan 1 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเติมเชื้อเลี้ยงในอาหารโดยใช้ pH อุณหภูมิ และแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ระยะเวลาการหมัก 0-7 วัน ในสภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 230 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างในระหว่างการหมักทุกวัน ตรวจวัดค่า pH วิเคราะห์การเจริญเติบโตของเชื้อ โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เพื่อตรวจสอบปริมาณเชื้อ และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้ DNS reagent เพื่อหา enzyme activity

## 3.5 การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity)

### 3.5.1 การเตรียมสารสกัดเอนไซม์

นำเชื้อแบคทีเรียที่มาเลี้ยงบน nutrient agar บ่มอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงใน nutrient broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm เพื่อตรวจสอบปริมาณเชื้อเริ่มต้น ถ่ายเชื้อลงในอาหาร CMC broth และ xylan broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 230 รอบต่อนาที เป็นเวลา 168 ชั่วโมง นำอาหารที่เพาะเลี้ยงแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้มาจากตัวอย่างน้ำหมักที่ได้มาแยกเซลล์ โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกเก็บส่วนใส (crude enzyme) แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### 3.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนวิธีของ Bradford (1976) โดยนำ crude enzyme 20 ไมโครลิตร ผสมในน้ำยาวัดโปรตีน (Bio-Rad) 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลาย โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve) ของ bovine serum albumin (BSA) เพื่อนำไปคำนวณสมการถดถอย  $y = ax + b$  โดยค่า  $y$  เป็นค่าการดูดกลืนแสงและค่า  $x$  เป็นค่าความเข้มข้นของสารละลาย BSA

### 3.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

นำ crude enzyme ไปวัดการทำงานของเอนไซม์ซึ่งการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ปริมาตรของปฏิกิริยาทั้งหมด 1 มิลลิลิตร ทำตามวิธีของ Miller (1959) โดยเตรียมชุดทดลอง 3 ชุด คือ

ชุดที่ 1 ประกอบด้วย หลอดที่มีน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร ที่มี CMC และสารละลายไซแลน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.01 M citrate buffer pH 6.0 และ pH 8.0 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร (substrate control; SC)

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

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

นำไปบ่มในเครื่องควบคุม (heat box) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับการศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสและ 50 องศาเซลเซียส สำหรับการศึกษาเอนไซม์ไซแลนเนส เป็นเวลา 10 นาที เติม 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้หายร้อน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm นำค่า OD จากชุดการทดลองชุดที่ 3 (ES) ที่วัดได้ลบด้วยค่าการดูดกลืนแสงของ OD จากชุดการทดลองชุดที่ 2 (EC) และ OD จากชุดการทดลองชุดที่ 1 (SC) ( $OD_{ES} - OD_{EC} - OD_{SC}$ ) จากนั้นนำค่า OD นี้ไปเทียบกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค) เพื่อนำไปคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (specific activity) และคำนวณค่าฤทธิ์สัมพันธ์ (relative activity) เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ในรูปร้อยละกิจกรรมที่เหลืออยู่โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่มีค่าสูงที่สุดคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์

### 3.5.4 การคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์ (enzyme activity)

กำหนดให้กิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) 1 Unit หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลาย CMC หรือ xylan ให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่เทียบเท่ากับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกปลดปล่อยออกมา 1  $\mu$ Mole ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด (Alves-Prado *et al.* 2010)

$$\begin{aligned} \text{ค่ากิจกรรมของเอนไซม์} & \quad \text{คำนวณได้จากสูตร} \\ \text{Enzyme activity (U/ml)} = & \quad \frac{\mu\text{Mole ของน้ำตาล reducing sugar ที่คำนวณได้} \times \text{dilution factor}}{\text{เวลาที่บ่ม (min)} \times \text{ปริมาตรเอนไซม์ที่ใส่ (มิลลิลิตร)}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์} & \quad \text{คำนวณได้จากสูตร} \\ \text{Specific activity (U/mg)} = & \quad \frac{\mu\text{Mole ของน้ำตาล reducing sugar ที่คำนวณได้} \times \text{dilution factor}}{\text{ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml)} \times \text{ปริมาตรเอนไซม์ที่ใส่ (ml)} \times \text{เวลาที่บ่ม (min)}} \end{aligned}$$

## 3.6 การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการทำกิจกรรมของเอนไซม์

### 3.6.1 เวลาที่เหมาะสม (optimal time)

ศึกษาผลของเวลาต่อการทำงานของเอนไซม์โดยเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ที่ค่าเวลา 10 - 60 นาที โดยเตรียมสารละลาย CMC ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และสารละลาย xylan ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตรต pH 6.0 สำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส และ สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต pH 8.0 สำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไซแลนเนส ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บ่มกับ crude enzyme 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 10, 20, 30, 45 และ 60 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส และ 50 องศาเซลเซียส สำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไซแลนเนส จากนั้นจึงทำการทดสอบเอนไซม์ด้วย DNS reagent

### 3.6.2 ค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสม (optimal pH)

ศึกษาผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์โดยเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ที่ค่า pH 3.0-10.0 โดย pH 3.0-6.0 ใช้สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตรต และ pH 7.0-10.0 ใช้สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตโดยเตรียมสารละลาย CMC และสารละลาย xylan ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ pH 3.0-10.0 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 M 300 ไมโครลิตร บ่มกับ crude enzyme 100 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส และ 50 องศาเซลเซียส สำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไคเลนเนส เป็นเวลาที่เหมาะสม จากนั้นจึงทำการทดสอบเอนไซม์ด้วย DNS reagent

### 3.6.3 อุณหภูมิที่เหมาะสม (optimal temperature)

บ่ม crude enzyme 100 ไมโครลิตร ตามเวลาและ pH ที่เหมาะสม ที่อุณหภูมิ 30-80 องศาเซลเซียส แล้วจากนั้นจึงทำการทดสอบเอนไซม์ด้วย DNS reagent

### 3.7 การวิเคราะห์การย่อยสลายสับสเตรทของเอนไซม์ (substrate specificity)

โดยสับสเตรทที่ใช้วิเคราะห์ มีดังนี้ คือ avicel 1 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับกลูโคสมาตรฐาน, xylan 1 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับไซโลสมาตรฐาน, CMC 1 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับกลูโคสมาตรฐาน และ filter paper เปรียบเทียบกับกลูโคสมาตรฐาน ในสภาวะที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุด ทำการทดสอบเอนไซม์ด้วย DNS reagent และหาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford (1976)

### 3.8 การเตรียมวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

- 1) ฟางข้าว นำมาจากทุ่งนา เขตลาดกระบัง ใช้มีดย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรแต่ละชนิดให้มีขนาด 1-2 เซนติเมตร เก็บใส่ขวดรูปชมพู่
- 2) ต้นข้าวโพด มาจากไร่ข้าวโพด บริเวณจังหวัดสมุทรปราการ นำมาตากให้แห้ง ใช้มีดย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรแต่ละชนิดให้มีขนาด 1-2 เซนติเมตรเก็บใส่ขวดรูปชมพู่
- 3) ใบอ้อย นำมาจากไร่อ้อย จังหวัดสมุทรปราการ นำมาตากให้แห้ง ใช้มีดย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรแต่ละชนิดให้มีขนาด 1-2 เซนติเมตร เก็บใส่ขวดรูปชมพู่

### 3.9 การทดสอบการปรับสภาพวัสดุที่เหมาะสม

#### 3.9.1 การปรับสภาพโดยคลื่นไมโครเวฟ (microwave)

ชั่งวัสดุ 1.5 กรัม ใส่ขวดชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร (Rodrigues *et al*, 2011) อบด้วยเครื่องไมโครเวฟที่กำลัง 800 วัตต์ นาน 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที นำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

#### 3.9.2 การปรับสภาพโดยความดันไอน้ำ (autoclave)

ชั่งวัสดุ 1.5 กรัม ใส่ขวดชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้น นำเข้าเครื่อง autoclave เป็นเวลานาน 10, 20 และ 30 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์ อุณหภูมิ 121 องศา

เซลเซียส นำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

### 3.10 การวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใยของวัสดุ

การวิเคราะห์องค์ประกอบของผนังเซลล์พืชด้วยวิธี Detergent method (Goering and Van Soest, 1970) วิเคราะห์ค่า Neutral Detergent Fiber (NDF), Acid Detergent Fiber (ADF), Lignin-Acid insoluble Ash (ADL) และ Acid Insoluble Ash (AIA) โดยคำนวณตามสูตร

ร้อยละ Hemicellulose = ร้อยละ NDF - ร้อยละ ADF

ร้อยละ Cellulose = ร้อยละ ADF - ร้อยละ ADL

ร้อยละ Lignin = ร้อยละ ADL - ร้อยละ AIA

### 3.11 การประเมินการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

#### 3.11.1 การย่อยด้วยเอนไซม์ทางการค้า

เตรียมเอนไซม์ทางการค้าเซลลูเลสจากเชื้อรา *Aspergillus niger* (Sigma.USA) โดยชั่ง 0.0231 กรัมต่อน้ำกลั่นสเตอร์ไรต์ 3 มิลลิลิตร จากสต็อกเข้มข้น 1.3 ยูนิต/มิลลิกรัม

นำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ฟางข้าว, ต้นข้าวโพด และ ใบอ้อย ซึ่งปรับสภาพด้วยวิธี microwave และ autoclave แล้วจำนวน 0.02 กรัม เติมน้ำบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตท 1 โมล ที่ pH 5 จำนวน 300 ไมโครลิตร และ เอนไซม์การค้า 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้ววัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้โดยใช้วิธี DNS method

#### 3.11.2 การย่อยด้วยเอนไซม์ที่ได้สกัดจากเชื้อแบคทีเรีย (crude enzyme)

นำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ฟางข้าว, ต้นข้าวโพด และ ใบอ้อย ซึ่งปรับสภาพด้วยวิธี microwave และ autoclave แล้วจำนวน 0.02 กรัม เติมน้ำบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตท 1 โมล จำนวน 300 ไมโครลิตร และ เอนไซม์ 100 ไมโครลิตร บ่มในบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH บ่มที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสม แล้วนำไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้โดยใช้ DNS reagent โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### 4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนส

หลังจากเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากกระเพาะหมักของกระบือบนอาหาร rumen fluid glucose cellobiose agar และบ่มเชื้อในสภาวะไร้อากาศเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด  $4.8 \times 10^4$  CFU/ml สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันได้ 32 ไอโซเลท (มานิสา บุพตา. 2555) เมื่อนำแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร CMC agar และ xylan agar พบแบคทีเรียที่สามารถย่อยเซลลูโลสและไซแลนได้ จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลทหมายเลข ID2R1P1 และ ID2R1P2 โดยที่ไอโซเลท ID2R1P1 สามารถย่อยอาหารแข็ง CMC agar มีอัตราส่วนวงใสต่อโคโลนี เท่ากับ  $2.53 \pm 0.37$  และย่อยอาหารแข็ง xylan agar มีอัตราส่วนวงใสต่อโคโลนี เท่ากับ  $2.09 \pm 0.13$  ตามลำดับ ขณะที่ไอโซเลท ID2R1P2 สามารถย่อยอาหารแข็ง CMC agar มีอัตราส่วนวงใสต่อโคโลนี เท่ากับ  $4.27 \pm 0.47$  และย่อยอาหารแข็ง xylan agar มีอัตราส่วนวงใสต่อโคโลนี เท่ากับ  $4.00 \pm 0.02$  ตามลำดับ จึงนำเชื้อแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทมาศึกษาการทำงานของเอนไซม์และการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่อไป

#### 4.2 ข้อมูลลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรีย

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ขนาด 1500 คู่เบส จากเชื้อไอโซเลท ID2R1P1 และ ID2R1P2 และนำมาวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าไอโซเลท ID2R1P1 มีความเหมือนมากที่สุดกับเชื้อแบคทีเรีย *Corynebacterium* sp. (X89778.1) โดยมีค่าความเหมือนเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ไอโซเลท ID2R1P2 มีค่าความเหมือนมากที่สุดกับเชื้อแบคทีเรีย *B. pumilus* strain NJM4 (EU234500.1) โดยมีค่าความเหมือนเท่ากับ 96 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งคาดว่าจะน่าจะเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่

ตารางที่ 4.1 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA จากไอโซเลท ID2R1P1 และ ID2R1P2 กับฐานข้อมูล GenBank

| Isolate | Accession  | Closest species                                 | identical nucleotides<br>(% Identity) |
|---------|------------|-------------------------------------------------|---------------------------------------|
| ID2R1P1 | X89778.1   | <i>Corynebacterium</i> sp. DNA for 16 rRNA      | 1443/1461 (99%)                       |
|         | AB559590.1 | Uncultured bacterium clone c_Control_A9         | 1449/1477 (98%)                       |
|         | JF274932.1 | <i>Brevibacterium</i> sp. PX20b_S1              | 1445/1474 (98%)                       |
|         | AJ620367.1 | <i>Bre. stationis</i> partial strain LMG 21670T | 1433/1462 (98%)                       |
|         | HQ202867.1 | <i>C. casei</i> strain T-51                     | 1406/1420 (99%)                       |
| ID2R1P2 | EU234500.1 | <i>B. pumilus</i> strain NJM4                   | 1364/1415 (96%)                       |
|         | DQ990034.1 | <i>Bacterium</i> 8-gw1-5                        | 1363/1415 (96%)                       |
|         | JX077091.1 | <i>B. altitudinis</i> strain -Y15               | 1363/1415 (96%)                       |
|         | HQ224625.1 | <i>B. altitudinis</i> strain SGb146             | 1363/1415 (96%)                       |
|         | GU726185.1 | <i>Bacillus</i> sp. KZ_AalM_Mm3                 | 1362/1414 (96%)                       |

#### 4.3 สภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

เมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P1 และ ID2R1P2 มาเลี้ยงในอาหาร LB broth บ่มที่อุณหภูมิห้อง 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เพื่อตรวจสอบปริมาณเชื้อเริ่มต้น หาสภาพที่เชื้อจะสามารถสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลายอาหารเลี้ยงเชื้อได้น้ำตาลรีดิวซ์ดีที่สุด โดยการหาอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดต่าง ปริมาณคาร์บอน ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ ผลการทดลองปรากฏดังนี้

##### 4.3.1 ผลของอุณหภูมิการบ่มเชื้อ

เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P1 และ ID2R1P2 ในอาหาร CMC broth และ xylan broth บ่มที่อุณหภูมิ 33, 35, 37, 39 และ 41 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 230 รอบต่อนาที พบว่า ไอโซเลท ID2R1P1 มีปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร CMC broth ที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส เท่ากับ  $1.946 \pm 0.010$  U/ml และมีปริมาณเอนไซม์ไซแลนเนสสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร xylan broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เท่ากับ  $57.439 \pm 0.013$  U/ml ขณะที่ไอโซเลท ID2R1P2 มีปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร CMC broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เท่ากับ  $0.230 \pm 0.113$  U/ml และมีปริมาณเอนไซม์ไซแลนเนสสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร xylan broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เท่ากับ  $0.477 \pm 0.023$  U/ml (ตารางที่ 4.2) และเมื่อพิจารณาปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสที่อุณหภูมิ 37 และ 39 องศาเซลเซียส พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน จึงเลือกสภาวะการบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อสามารถผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิดได้พร้อมกัน

ตารางที่ 4.2 ผลของอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ของไอโซเลท ID2R1P1 และ ID2R1P2

| Temperature<br>(°C) | ปริมาณเอนไซม์ (U/ml) |                      |                     |                     |
|---------------------|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
|                     | ID2R1P1              |                      | ID2R1P2             |                     |
|                     | Cellulase            | Xylanase             | Cellulase           | Xylanase            |
| 33                  | $1.393 \pm 0.056$    | $19.055 \pm 0.009$   | $0.000 \pm 0.023$   | $0.277 \pm 0.037$   |
| 35                  | $0.456 \pm 0.031$    | $13.978 \pm 0.051$   | $0.039 \pm 0.003$   | $0.277 \pm 0.074$   |
| 37                  | $1.059 \pm 0.009$    | $57.439 \pm 0.013^*$ | $0.230 \pm 0.113^*$ | $0.390 \pm 0.036$   |
| 39                  | $1.946 \pm 0.010^*$  | $41.282 \pm 0.006$   | $0.217 \pm 0.068$   | $0.477 \pm 0.023^*$ |
| 41                  | $1.027 \pm 0.001$    | $12.813 \pm 0.017$   | $0.000 \pm 0.018$   | $0.300 \pm 0.107$   |

\*ค่าสูงสุด, ค่าเฉลี่ยการทดลอง 3 ครั้ง

##### 4.3.2 ผลของความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P1 และ ID2R1P2 ในอาหาร CMC broth และ xylan broth ที่ปรับค่า pH ให้ได้ 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 ตามลำดับ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน พบว่า ไอโซเลท ID2R1P1 มีปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร CMC broth ที่มี pH 7.0 เท่ากับ  $2.034 \pm 0.039$  U/ml และมีปริมาณเอนไซม์ไซแลนเนสสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร xylan broth ที่มี pH 3.0 เท่ากับ  $183.272 \pm 0.011$  U/ml ขณะที่ไอโซเลท

ID2R1P2 มีปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร CMC broth ที่มี pH 5.0 เท่ากับ  $3.538 \pm 0.051$  U/ml และมีปริมาณเอนไซม์ไคแลนเนสสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร xylan broth ที่มี pH 4.0 เท่ากับ  $0.635 \pm 0.048$  U/ml (ตารางที่ 4.3)

**ตารางที่ 4.3** ผลของค่าความเป็นกรดต่างในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ของไอโซเลท ID2R1P1 และ ID2R1P2

| pH  | ปริมาณเอนไซม์ (U/ml) |                       |                     |                     |
|-----|----------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|
|     | ID2R1P1              |                       | ID2R1P2             |                     |
|     | Cellulase            | Xylanase              | Cellulase           | Xylanase            |
| 3.0 | $0.543 \pm 0.009$    | $183.272 \pm 0.011^*$ | $0.000 \pm 0.042$   | $0.268 \pm 0.139$   |
| 4.0 | $0.386 \pm 0.001$    | $126.904 \pm 0.023$   | $0.000 \pm 0.030$   | $0.635 \pm 0.033^*$ |
| 5.0 | $1.866 \pm 0.053$    | $39.076 \pm 0.015$    | $3.538 \pm 0.051^*$ | $0.541 \pm 0.048$   |
| 6.0 | $1.632 \pm 0.026$    | $32.634 \pm 0.023$    | $3.145 \pm 0.103$   | $0.498 \pm 0.028$   |
| 7.0 | $2.034 \pm 0.039^*$  | $9.636 \pm 0.010$     | $1.939 \pm 0.114$   | $0.449 \pm 0.062$   |
| 8.0 | $1.220 \pm 0.081$    | $5.968 \pm 0.009$     | $1.820 \pm 0.115$   | $0.430 \pm 0.029$   |
| 9.0 | $1.454 \pm 0.066$    | $4.080 \pm 0.002$     | $0.840 \pm 0.043$   | $0.401 \pm 0.017$   |

\*ค่าสูงสุด, ค่าเฉลี่ยการทดลอง 3 ครั้ง

#### 4.3.3 ผลของปริมาณแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P1 และ ID2R1P2 ในอาหาร CMC broth และ xylan broth ที่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันคือ CMC 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และอาหาร xylan broth ที่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันคือ xylan 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน พบว่า ไอโซเลท ID2R1P1 มีปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี 1% CMC เท่ากับ  $0.821 \pm 0.002$  U/ml และมีปริมาณเอนไซม์ไคแลนเนสสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี 2% xylan เท่ากับ  $134.004 \pm 0.012$  U/ml (ตารางที่ 4.4) ขณะที่ไอโซเลท ID2R1P2 มีปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี 3% CMC และมีปริมาณเอนไซม์ไคแลนเนสสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี 1% xylan (มานิสา บุพตา 2555)

**ตารางที่ 4.4** ผลของปริมาณคาร์บอนซีเมติลเซลลูโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ของไอโซเลท ID2R1P1

| % Carbon | ปริมาณเอนไซม์ Cellulase (U/ml) |                       |
|----------|--------------------------------|-----------------------|
|          | CMC                            | Xylan                 |
| 1 %      | $0.821 \pm 0.002^*$            | $75.547 \pm 0.052$    |
| 2 %      | $0.161 \pm 0.010$              | $134.004 \pm 0.012^*$ |
| 3 %      | $0.297 \pm 0.023$              | $63.812 \pm 0.028$    |

\*ค่าสูงสุด, ค่าเฉลี่ยการทดลอง 3 ครั้ง

#### 4.3.4 ผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P1 และ ID2R1P2 ในอาหาร CMC broth และ xylan broth ที่มีแหล่งไนโตรเจน คือ yeast extract, urea และ tryptone ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน พบว่า เชื้อทั้งสองไอโซเลทสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสได้ดีที่สุดในอาหารเหลวที่มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ทั้งนี้ไอโซเลท ID2R1P1 ผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิดได้มากกว่าเชื้อ ID2R1P2 (ตารางที่ 4.5) เนื่องจาก yeast extract สกัดจากยีสต์ซึ่งมีวิตามินบีมาก และมีสารประกอบของคาร์บอนและไนโตรเจน ซึ่งเป็นสารที่แบคทีเรียใช้ในการเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ได้ดี (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2552)

ตารางที่ 4.5 ผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ของไอโซเลท ID2R1P1 และ ID2R1P2

| Nitrogen source    | ปริมาณเอนไซม์ (U/ml) |              |              |              |
|--------------------|----------------------|--------------|--------------|--------------|
|                    | ID2R1P1              |              | ID2R1P2      |              |
|                    | Cellulase            | Xylanase     | Cellulase    | Xylanase     |
| 0.1% Urea          | 0.562±0.001          | 2.468±0.060  | 0.000±0.007  | 0.401±0.044  |
| 0.1% Tryptone      | 1.862±0.035          | 2.112±0.014  | 0.038±0.006  | 0.660±0.060  |
| 0.1% Yeast extract | 2.165±0.020*         | 2.602±0.060* | 0.087±0.010* | 0.687±0.078* |

#### 4.3.5 ผลของระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ

เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P1 และ ID2R1P2 ในอาหาร CMC broth และ xylan broth บ่มที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาแตกต่างกันคือ 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน ตามลำดับในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 230 รอบต่อนาที พบว่า ไอโซเลท ID2R1P1 มีปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวนาน 2 วัน เท่ากับ 1.248±0.005 U/ml และ 50.728±0.116 U/ml ตามลำดับ ขณะที่ไอโซเลท ID2R1P2 มีปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวนาน 5 วัน เท่ากับ 1.756±0.044U/ml และมีปริมาณเอนไซม์ไซแลนเนสสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวนาน 3 วัน เท่ากับ 0.786±0.111 U/ml (ตารางที่ 4.6)

ตารางที่ 4.6 ผลของระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ของไอโซเลท ID2R1P1 และ ID2R1P2

| ระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ | ปริมาณเอนไซม์ (U/ml) |               |              |              |
|---------------------|----------------------|---------------|--------------|--------------|
|                     | ID2R1P1              |               | ID2R1P2      |              |
|                     | Cellulase            | Xylanase      | Cellulase    | Xylanase     |
| 1 วัน               | 0.820±0.006          | 31.806±0.024  | 0.452±0.040  | 0.537±0.010  |
| 2 วัน               | 1.248±0.005*         | 50.728±0.116* | 1.165±0.039  | 0.782±0.033  |
| 3 วัน               | 0.750±0.015          | 25.502±0.067  | 1.482±0.048  | 0.786±0.111* |
| 4 วัน               | 1.124±0.010          | 33.302±0.029  | 1.148±0.177  | 0.272±0.046  |
| 5 วัน               | 1.152±0.019          | 28.879±0.496  | 1.756±0.044* | 0.186±0.115  |
| 6 วัน               | -                    | -             | 1.627±0.131  | 0.219±0.020  |
| 7 วัน               | -                    | -             | 1.219±0.076  | 0.339±0.022  |

#### 4.3.6 ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

นำเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P1 ที่ให้กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสบนอาหารแข็งมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารเหลว LB broth ซึ่งมีการเพิ่มปริมาณกลูโคสลงไปอาหาร 0.01เปอร์เซ็นต์ และเติมเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ ฟางข้าว ชานอ้อย และซังข้าวโพด ซึ่งวัสดุเหล่านี้นำมาบดให้เล็กลงด้วยเครื่องบดน้ำผลไม้ ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 40 mesh ล้างน้ำตาลออกด้วยน้ำกลั่น กรองน้ำทิ้ง แล้วอบแห้งที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำมาผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อตามความเข้มข้น บ่มในตู้บ่มที่สภาวะการเขย่า 230 รอบต่อนาที บ่มนาน 3 วัน พบว่า .ไบอ้อยสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด เท่ากับ 5.280 U/ml ขณะที่ต้นข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส เท่ากับ 233.950 U/ml (ตารางที่ 4.7)

**ตารางที่ 4.7** การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสของไอโซเลท ID2R1P1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอน

| ชนิดวัตถุดิบ | ปริมาณเอนไซม์ (U/ml) |          |
|--------------|----------------------|----------|
|              | Cellulase            | Xylanase |
| ฟางข้าว      | 2.590                | 129.690  |
| ต้นข้าวโพด   | 3.570                | 233.950  |
| ไบอ้อย       | 5.280                | 214.840  |

#### 4.4 สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์สกัด

เพื่อให้ทราบถึงคุณสมบัติการทำงานของเอนไซม์ที่ผลิตได้จากไอโซเลท ID2R1P1 และ ID2R1P2 ที่คัดแยกจากกระเพาะรูเมนกระบือ นำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหาร LB broth ตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้ โดยสภาวะการเขย่าด้วยความเร็วรอบ 230 รอบต่อนาที ทำการศึกษาระยะเวลาในการบ่ม ค่าความเป็นกรดต่าง และอุณหภูมิที่เอนไซม์จะทำงานได้ประสิทธิภาพสูงที่สุด โดยนำเอนไซม์สกัด (crude enzyme) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อมาศึกษาคุณสมบัติการทำงานของเอนไซม์ ผลการทดลองปรากฏดังนี้

##### 4.4.1 ผลของระยะเวลาต่อการทำงานของเอนไซม์

เมื่อทดสอบการทำงานของเอนไซม์สกัดหลังการบ่มนาน 5-60 นาที เอนไซม์ที่สกัดจากแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P1 มีกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดหลังจากบ่มนาน 10 นาที โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ  $17.407 \pm 0.022$  U/mg (100%) และมีกิจกรรมเอนไซม์ไซแลนเนสสูงสุดหลังจากบ่มเป็นเวลา 5 นาที เท่ากับ  $229.130 \pm 0.037$  U/mg (100%) เอนไซม์ที่สกัดจากแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P2 มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดหลังจากบ่มนาน 10 นาที โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส เท่ากับ  $3.265 \pm 0.023$  U/mg (100%) และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซแลนเนส เท่ากับ  $0.136 \pm 0.023$  U/mg (100%) ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8) เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบ่มปฏิกิริยาเอนไซม์นานขึ้นพบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ทั้งสองชนิดลดลงอย่างรวดเร็ว (ภาพที่ 4.1 a, b)

**ตารางที่ 4.8** ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสของเชื้อ ID2R1P1 และ ID2R1P2 เมื่อทำปฏิกิริยาในระยะเวลาที่ต่างกัน

| ระยะเวลา (นาท) | Specific activity (U/mg) |               |              |              |
|----------------|--------------------------|---------------|--------------|--------------|
|                | ID2R1P1                  |               | ID2R1P2      |              |
|                | Cellulase                | Xylanase      | Cellulase    | Xylanase     |
| 5              | 12.724±0.005             | 229.13±0.041* | -            | -            |
| 10             | 17.407±0.026*            | 116.389±0.051 | 3.265±0.023* | 0.136±0.023* |
| 15             | 15.789±0.020             | 79.742±0.055  | -            | -            |
| 20             | 13.706±0.012             | 58.373±0.008  | 1.515±0.395  | 0.052±0.023  |
| 30             | -                        | -             | 0.844±0.042  | 0.036±0.013  |
| 45             | -                        | -             | 0.696±0.075  | 0.023±0.008  |
| 60             | -                        | -             | 0.585±0.009  | 0.020±0.002  |

\*ค่าสูงสุด, ค่าเฉลี่ยการทดลอง 3 ครั้ง

#### 4.4.2 ผลของความเป็นกรดต่อการทำงานของเอนไซม์

เมื่อทดสอบการทำงานของเอนไซม์สกัดในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH 3.0-10.0 พบว่า เอนไซม์ที่สกัดจากแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P1 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้งเซลลูเลสและไซแลนเนสมีค่าสูงสุดที่ระดับ pH 7.0 เท่ากับ 6.154±0.003 U/mg (100%) และ 372.008±0.055 U/mg (100%) ตามลำดับ ขณะที่เอนไซม์ที่สกัดจากแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P2 มีกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุด ที่ pH 6.0 เท่ากับ 6.757±0.170 U/mg (100%) และ มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซแลนเนสสูงสุดที่ pH 8.0 เท่ากับ 0.534±0.017 U/mg (100%) ตามลำดับ (ตารางที่ 4.9) เอนไซม์ที่สกัดจากแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P1 ทำงานได้ดีในช่วง pH ที่กว้างตั้งแต่ 3.0-9.0 ขณะที่เอนไซม์สกัดจากไอโซเลท ID2R1P2 ไม่ทนต่อการเปลี่ยนแปลงค่า pH (ภาพที่ 4.2 a,b)

#### 4.4.3 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์

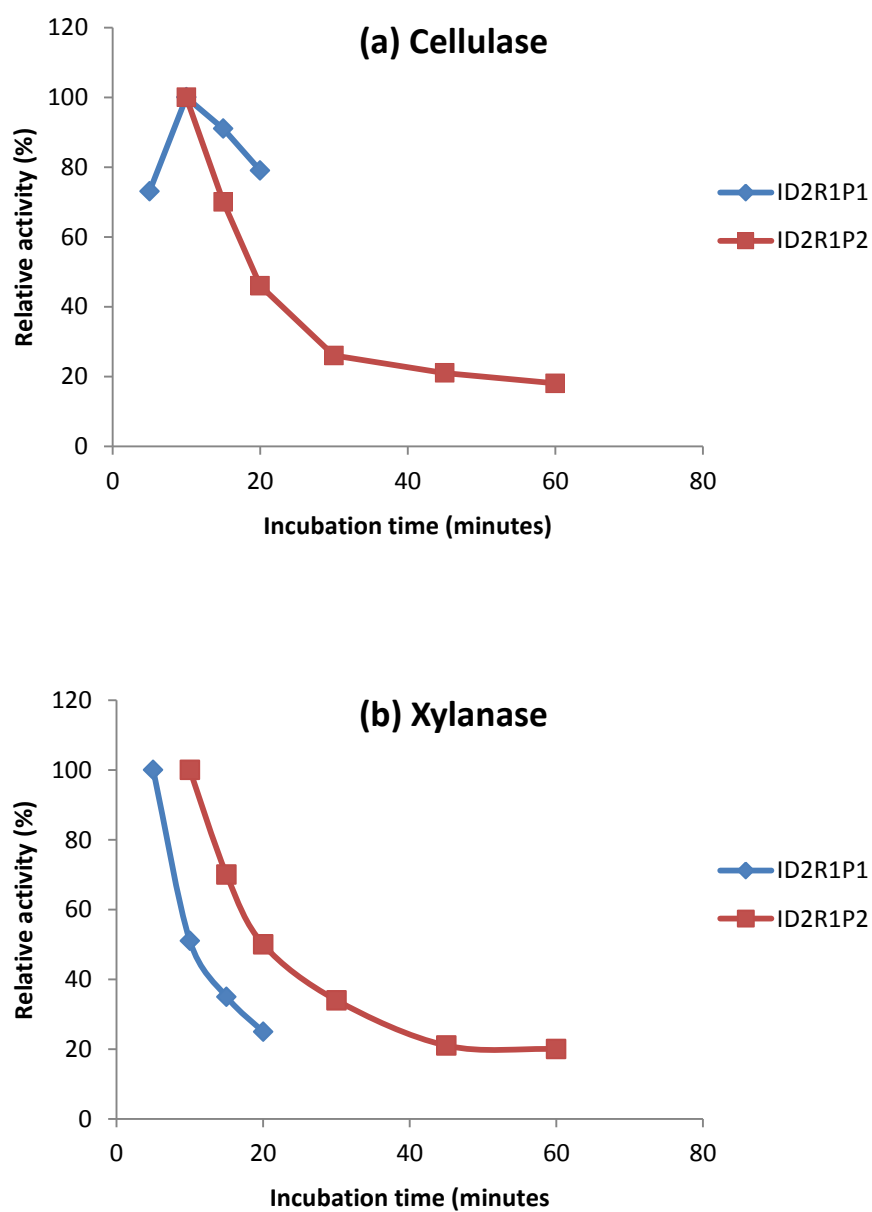
เมื่อทดสอบการทำงานของเอนไซม์สกัดในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตท pH 7.0 บ่มเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 30-90 องศาเซลเซียส พบว่า เอนไซม์ที่สกัดจากแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P1 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้งเซลลูเลสสูงสุดเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เท่ากับ 24.926±0.002 U/mg (100%) ขณะที่เอนไซม์ไซแลนเนสมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เท่ากับ 224.349±0.067 U/mg (100%) เอนไซม์ที่สกัดจากแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P2 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้งเซลลูเลสสูงสุดเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เท่ากับ 4.729±0.380 U/mg (100%) ขณะที่เอนไซม์ไซแลนเนสมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เท่ากับ 0.947±0.032 U/mg (100%) (ตารางที่ 4.10) เอนไซม์สกัดจากไอโซเลท ID2R1P1 มีค่ากิจกรรมของไซแลนเนสค่อนข้างดีตลอดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิตั้งแต่ 30-90 องศาเซลเซียส ขณะที่เอนไซม์สกัดจากไอโซเลท ID2R1P2 มีกิจกรรมไซแลนเนสดีขึ้นเมื่อทำการเพิ่มอุณหภูมิ (ภาพที่ 4.3 a, b)

ตารางที่ 4.9 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลันเนสของเชื้อ ID2R1P1 และ ID2R1P2 เมื่อทำปฏิกิริยาในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่างต่างกัน

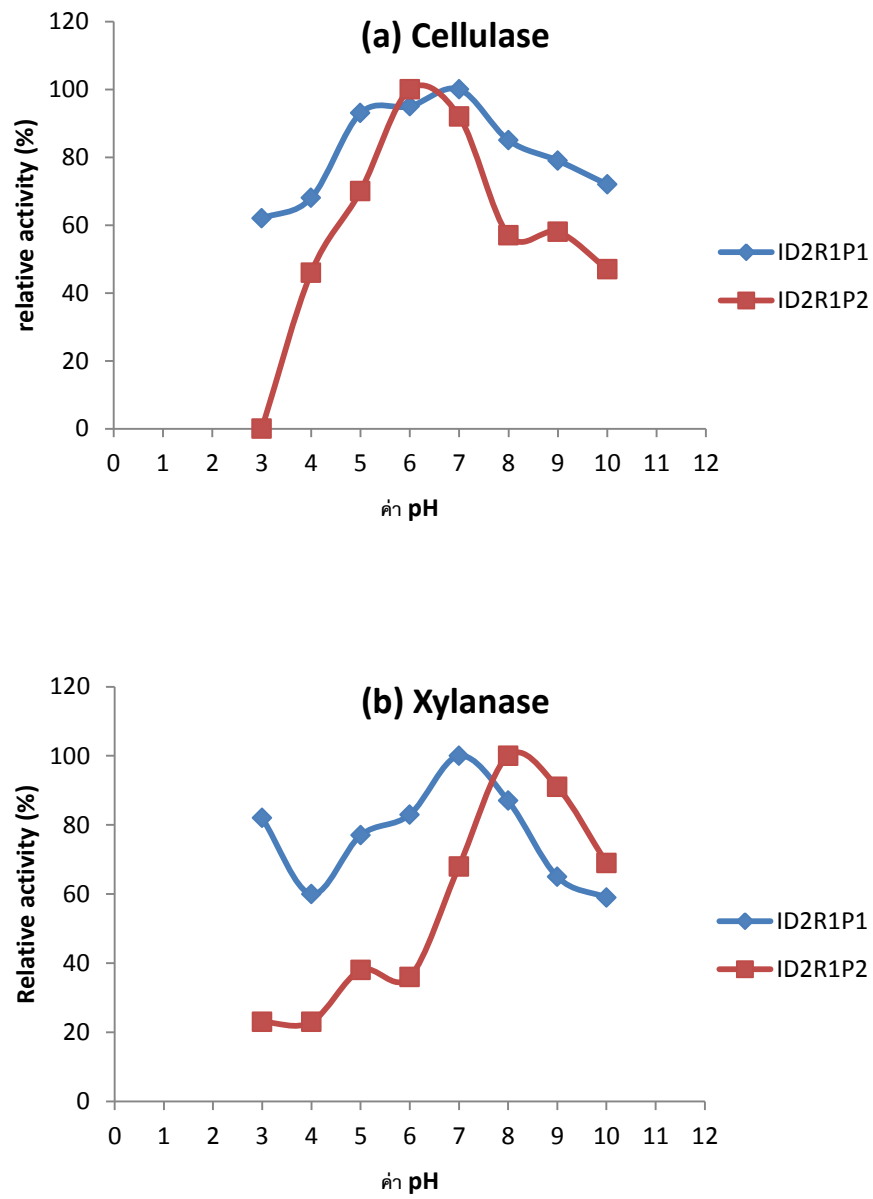
| ค่า pH | Specific activity (U/mg) |                |              |              |
|--------|--------------------------|----------------|--------------|--------------|
|        | ID2R1P1                  |                | ID2R1P2      |              |
|        | Cellulase                | Xylanase       | Cellulase    | Xylanase     |
| 3.0    | 3.837±0.002              | 304.323±0.032  | 0.000±0.767  | 0.122±0.011  |
| 4.0    | 4.188±0.010              | 223.457±0.079  | 2.846±0.753  | 0.125±0.010  |
| 5.0    | 5.748±0.014              | 286.161±0.007  | 4.703±0.678  | 0.204±0.014  |
| 6.0    | 5.842±0.006              | 307.478±0.084  | 6.757±0.170* | 0.192±0.008  |
| 7.0    | 6.154±0.002*             | 372.088±0.055* | 6.220±0.127  | 0.364±0.015  |
| 8.0    | 5.241±0.031              | 325.494±0.190  | 3.856±0.636  | 0.534±0.017* |
| 9.0    | 4.857±0.024              | 240.713±0.237  | 3.942±0.550  | 0.488±0.014  |
| 10.0   | 4.427±0.009              | 219.124±0.052  | 3.183±0.553  | 0.367±0.015  |

ตารางที่ 4.10 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลันเนสของเชื้อ ID2R1P1 และ ID2R1P2 เมื่อบ่มในอุณหภูมิที่ต่างกัน

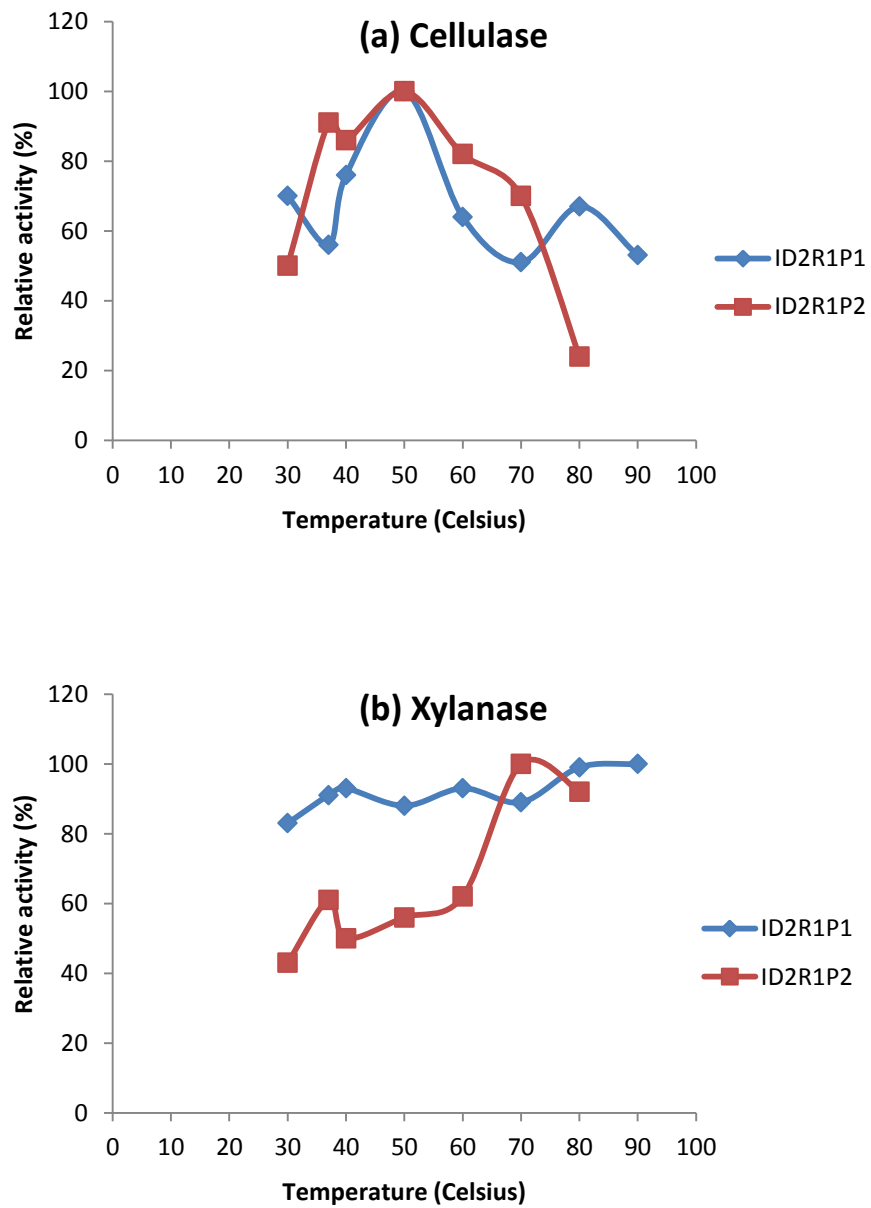
| อุณหภูมิ (°C) | Specific activity (U/mg) |                |              |              |
|---------------|--------------------------|----------------|--------------|--------------|
|               | ID2R1P1                  |                | ID2R1P2      |              |
|               | Cellulase                | Xylanase       | Cellulase    | Xylanase     |
| 30            | 17.509±0.032             | 185.454±0.056  | 2.381±0.375  | 0.412±0.009  |
| 37            | 14.006±0.005             | 204.978±0.018  | 4.297±0.424  | 0.580±0.010  |
| 40            | 18.859±0.023             | 207.912±0.026  | 4.063±0.422  | 0.473±0.042  |
| 50            | 24.926±0.002*            | 198.301±0.040  | 4.729±0.380* | 0.491±0.015  |
| 60            | 15.967±0.025             | 209.138±0.036  | 3.883±0.236  | 0.534±0.017  |
| 70            | 12.603±0.021             | 199.898±0.062  | 3.302±0.388  | 0.947±0.032* |
| 80            | 16.591±0.021             | 223.738±0.021  | 1.138±0.433  | 0.876±0.018  |
| 90            | 13.313±0.000             | 224.349±0.067* | -            | -            |



ภาพที่ 4.1 ค่าฤทธิ์สัมพันธ์ของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (a) และไซแลนเนส (b) ในช่วงระยะเวลาของการบ่มที่แตกต่างกัน



ภาพที่ 4.2 ค่าฤทธิ์สัมพันธ์ของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (a) และไซแลนเนส (b) ในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่างที่แตกต่างกัน



ภาพที่ 4.3 ค่าฤทธิ์สัมพันธ์ของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (a) และไซแลนเนส (b) ในอุณหภูมิของการบ่มที่แตกต่างกัน

#### 4.5 ประสิทธิภาพการย่อยสลายสับสเตรทของเอนไซม์ (Substrate specificity)

เมื่อนำเอนไซม์สกัดจากแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P1 และ ID2R1P2 มาทดสอบการย่อยสับสเตรท ได้แก่ CMC, xylan, avicel pH101 และ filter paper (Whatman No. 1) ตามสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิด พบว่า เอนไซม์ที่สกัดจากเชื้อแบคทีเรียทั้งสองจากไอโซเลทสามารถย่อย xylan ได้ดีกว่าสับสเตรทที่มีโพลิเมอร์ชนิดเซลลูโลส โดยที่เอนไซม์สกัดจาก ID2R1P1 มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงสุด เท่ากับ  $263.980 \pm 0.017$  U/mg ขณะที่เอนไซม์จาก ID2R1P2 มีค่ากิจกรรมจำเพาะต่ำ เท่ากับ  $1.364 \pm 0.002$  U/mg เอนไซม์สกัดจาก ID2R1P1 สามารถย่อย CMC และ Avicel ได้ใกล้เคียงกัน และสามารถย่อยกระดาษกรองได้เล็กน้อย กล่าวได้ว่าเอนไซม์จากแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P1 มีกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสทั้งแบบเอนโดกลูคาเนสและเอกโซกลูคาเนส ขณะที่เอนไซม์จากแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P2 ย่อยสับสเตรท CMC และ filter paper ได้เล็กน้อย และไม่ย่อย Avicel (ตารางที่ 4.11)

ตารางที่ 4.11 ความสามารถต่อการย่อยสับสเตรทของเอนไซม์ ID2R1P1 และ ID2R1P2

| สารตั้งต้น   | Specific activity (U/mg) |                   |
|--------------|--------------------------|-------------------|
|              | เอนไซม์ ID2R1P1          | เอนไซม์ ID2R1P2   |
| CMC          | $21.243 \pm 0.053$       | $0.626 \pm 0.041$ |
| Xylan        | $263.980 \pm 0.017$      | $1.364 \pm 0.002$ |
| Avicel       | $18.439 \pm 0.016$       | <0.001            |
| filter paper | $8.700 \pm 0.052$        | $0.062 \pm 0.003$ |

#### 4.6 ผลการปรับสภาพเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

การปรับสภาพเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อย ได้แก่ ฟางข้าว ต้นข้าวโพด และใบอ้อย โดยวัสดุทั้ง 3 ชนิดจะมีองค์ประกอบของเซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสที่แตกต่างกัน ซึ่งการทดสอบการย่อยเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรนี้จะทดสอบด้วยเอนไซม์ทางการค้า

##### 4.6.1 วิธีปรับสภาพด้วย microwave

เมื่อการย่อยสลายของเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร 3 ชนิด โดยอบด้วยเครื่องไมโครเวฟที่ กำลัง 800 วัตต์ นาน 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที และนำมาทดสอบการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า พบว่า วิธีปรับสภาพด้วย microwave สามารถปรับสภาพวัสดุได้ค่อนข้างดี โดยฟางข้าวจะถูกย่อยได้ดีที่สุด เมื่อผ่านคลื่นไมโครเวฟนาน 30 นาที ขณะที่ใบอ้อยและต้นข้าวโพดจะถูกย่อยได้เมื่อผ่านคลื่นไมโครเวฟเพียง 5-10 นาที (ตารางที่ 4.12)

**ตารางที่ 4.12** การปรับสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยวิธี microwave

| เวลา microwave<br>(นาทีก) | ปริมาณกลูโคส (mM) |        |            |
|---------------------------|-------------------|--------|------------|
|                           | ฟางข้าว           | ใบอ้อย | ต้นข้าวโพด |
| 0                         | 0.53              | 0.19   | 1.69       |
| 5                         | 0.38              | 0.21   | 1.78       |
| 10                        | 0.62              | 0.78   | 0.38       |
| 15                        | 0.44              | 0.12   | 0.15       |
| 20                        | 0.39              | 0.40   | 0.39       |
| 25                        | 1.32              | 0.38   | 0.44       |
| 30                        | 2.32              | 0.05   | 0.66       |

#### 4.6.2 วิธีปรับสภาพด้วย autoclave

เมื่อทำการย่อยสลายของเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร 3 ชนิด โดยอบด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 0, 10, 20 และ 30 นาที และนำมาทดสอบการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า พบว่า การย่อยของต้นข้าวโพดและใบอ้อยดีที่สุดเมื่อผ่านการปรับสภาพวัสดุด้วยความดันไอน้ำนาน 20 นาที ขณะที่ฟางข้าวจะถูกย่อยได้ดีเมื่อผ่านความดันไอน้ำนาน 10 นาที (ตารางที่ 4.13)

**ตารางที่ 4.13** การปรับสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยวิธี autoclave

| เวลา autoclave<br>(นาทีก) | ปริมาณกลูโคส (mM) |        |            |
|---------------------------|-------------------|--------|------------|
|                           | ฟางข้าว           | ใบอ้อย | ต้นข้าวโพด |
| 0                         | 0.09              | 1.09   | 1.69       |
| 10                        | 0.19              | 0.52   | 1.42       |
| 20                        | 0.08              | 1.49   | 1.94       |
| 30                        | 0.10              | 0.26   | 0.96       |

#### 4.7 ประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

เมื่อนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร 3 ชนิด ทำการปรับสภาพวัสดุตามวิธีที่เหมาะสม คือ ฟางข้าวผ่านการอบด้วยคลื่นไมโครเวฟนาน 30 นาที ส่วนใบอ้อยและต้นข้าวโพดนำมาผ่านการอบด้วยความดันไอน้ำนาน 20 นาที แล้วทำการย่อยด้วยเอนไซม์สกัดจากไอโซเลท ID2R1P1 และ ID2R1P2 บ่มในสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์แต่ละชนิด นาน 30 นาที พบว่า เอนไซม์สกัดจากไอโซเลท ID2R1P1 สามารถย่อยใบอ้อยและต้นข้าวโพดได้ดีกว่า ขณะที่เอนไซม์สกัดจากไอโซเลท ID2R1P2 ย่อยฟางข้าวได้ดีกว่า (ตารางที่ 4.14)

ตารางที่ 4.14 ประสิทธิภาพการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรของเอนไซม์ ID2R1P1 และ ID2R1P2

| วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร | ปริมาณกลูโคสจากการย่อยวัสดุ (mM) |                 |
|---------------------------|----------------------------------|-----------------|
|                           | เอนไซม์ ID2R1P1                  | เอนไซม์ ID2R1P2 |
| ฟางข้าว                   | 3.75                             | 4.21            |
| ใบอ้อย                    | 13.63                            | 2.87            |
| ต้นข้าวโพด                | 9.36                             | 6.02            |

## บทที่ 5

### สรุปผลและข้อเสนอแนะ

เมื่อคัดเลือกแบคทีเรียจากกระเพาะหมักของกระบือบนอาหาร RFGC agar และนำมาเพาะเลี้ยงต่อบนอาหาร CMC agar และ xylan agar พบว่า ไอโซเลท ID2R1P1 และ ID2R1P2 สามารถย่อยเซลลูโลสและไซแลนบนอาหารแข็งได้ โดยที่ไอโซเลท ID2R1P1 สามารถย่อยอาหารแข็ง CMC agar มีอัตราส่วนวงใสต่อโคโลนี เท่ากับ  $2.53 \pm 0.37$  และย่อยอาหารแข็ง xylan agar มีอัตราส่วนวงใสต่อโคโลนี เท่ากับ  $2.09 \pm 0.13$  ตามลำดับ ขณะที่ไอโซเลท ID2R1P2 สามารถย่อยอาหารแข็ง CMC agar มีอัตราส่วนวงใสต่อโคโลนี เท่ากับ  $4.27 \pm 0.47$  และย่อยอาหารแข็ง xylan agar มีอัตราส่วนวงใสต่อโคโลนี เท่ากับ  $4.00 \pm 0.02$  ตามลำดับ จึงนำเชื้อแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทมาศึกษา

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ขนาด 1500 คู่เบส จากเชื้อไอโซเลท ID2R1P1 และ ID2R1P2 และนำมาวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าไอโซเลท ID2R1P1 มีความเหมือนมากที่สุดกับเชื้อแบคทีเรีย *Corynebacterium* sp. (X89778.1) โดยมีค่าความเหมือนเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ไอโซเลท ID2R1P2 มีความเหมือนมากที่สุดกับเชื้อแบคทีเรีย *B. pumilus* strain NJM4 (EU234500.1) โดยมีค่าความเหมือนเท่ากับ 96 เปอร์เซ็นต์

เมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P1 และ ID2R1P2 มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ พบว่า การเลี้ยงเชื้อไอโซเลท ID2R1P1 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด ( $2.034 \pm 0.039$  U/ml) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร CMC broth ที่มีความเข้มข้น CMC 3 เปอร์เซ็นต์ และ yeast extract 0.1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส pH 7.0 เป็นเวลา 2 วัน และสามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้สูงสุด ( $183.272 \pm 0.011$  U/ml) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร xylan broth ที่ความเข้มข้นไซแลน 1 เปอร์เซ็นต์ และ yeast extract 0.1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส pH 3.0 เป็นเวลา 2 วัน ขณะที่การเลี้ยงเชื้อไอโซเลท ID2R1P2 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด ( $3.538 \pm 0.051$  U/ml) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร CMC broth ที่มีความเข้มข้น CMC 3 เปอร์เซ็นต์ และ yeast extract 0.1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส pH 5.0 เป็นเวลา 5 วัน และสามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้สูงสุด ( $0.786 \pm 0.111$  U/ml) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร xylan broth ที่ความเข้มข้นไซแลน 1 เปอร์เซ็นต์ และ yeast extract 0.1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส pH 4.0 เป็นเวลา 3 วัน (ตารางที่ 5.1) นอกจากนี้เมื่อนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ พบว่า ใบอ้อยสามารถใช้ในการผลิตเซลลูเลสได้ดี ขณะที่ต้นข้าวโพดและฟางข้าวสามารถใช้ในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้ดี

เมื่อศึกษาคุณสมบัติการทำงานของเอนไซม์สกัดจากทั้งสองไอโซเลท พบว่า เอนไซม์สกัดจากไอโซเลท ID2R1P1 มีการทำงานของเซลลูเลสได้ดีที่สุด ( $21.243 \pm 0.053$  U/mg) เมื่อบ่มในบัฟเฟอร์ pH 6.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และมีการทำงานของไซแลนเนสดีที่สุด ( $263.980 \pm 0.017$  U/mg) เมื่อบ่มในบัฟเฟอร์ pH 8.0 ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เอนไซม์สามารถย่อยคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส ไซแลน และ กระดาษกรองได้ดี และย่อยอะไวเซลได้เล็กน้อย ขณะที่เอนไซม์สกัดจากไอโซเลท ID2R1P2 มีการทำงานของเซลลูเลสได้ดีที่สุด ( $0.626 \pm 0.041$  U.mg) เมื่อบ่มในบัฟเฟอร์ pH 6.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และมีการทำงานของไซแลนเนสดีที่สุด ( $1.364 \pm 0.002$

U/mg) เมื่อบ่มในบัฟเฟอร์ pH 8.0 ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เอนไซม์สามารถย่อยคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส ไซแลน และ กระดาษกรอง ได้เล็กน้อย (ตารางที่ 5.1)

**ตารางที่ 5.1** สรุปสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์และคุณสมบัติการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P1 และ ID2R1P2

|                                         | ID2R1P1                  |                    | ID2R1P2            |                    |
|-----------------------------------------|--------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                                         | Cellulase                | Xylanase           | Cellulase          | Xylanase           |
| <b>สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ:</b> |                          |                    |                    |                    |
| Temperature                             | 39°C                     | 37°C               | 37°C               | 39°C               |
| pH                                      | 7.0                      | 3.0                | 5.0                | 4.0                |
| Carbon source                           | 1% CMC                   | 2% xylan           | 3% CMC             | 1% xylan           |
| Nitrogen source                         | 0.1% yeast extract       | 0.1% yeast extract | 0.1% yeast extract | 0.1% yeast extract |
| Incubation time                         | 2 d                      | 2 d                | 5 d                | 3 d                |
| Max. Yield (U/ml)                       | 2.034±0.039              | 183.272±0.011      | 3.538±0.051        | 0.786±0.111        |
| <b>คุณสมบัติการทำงานของเอนไซม์:</b>     |                          |                    |                    |                    |
| Optimal time                            | 10 min                   | 5 min              | 10 min             | 10 min             |
| Optimal pH                              | 7.0                      | 7.0                | 5.0                | 8.0                |
| Optimal temperature                     | 50°C                     | 90°C               | 50°C               | 70°C               |
| Substrate specificity                   | CMC, avicel filter paper | xylan              | CMC filter paper   | xylan              |
| Max. activity (U/mg)                    | 21.243±0.053             | 263.980±0.017      | 0.626±0.041        | 1.364±0.002        |

เมื่อนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร 3 ชนิด มาทำการปรับสภาพวัสดุตามวิธีที่เหมาะสม คือ ฟางข้าวผ่านการอบด้วยคลื่นไมโครเวฟนาน 30 นาที ส่วนใบอ้อยและต้นข้าวโพดนำมาผ่านการอบด้วยความดันไอน้ำนาน 20 นาที แล้วทำการย่อยด้วยเอนไซม์สกัดจากไอโซเลท ID2R1P1 และ ID2R1P2 บ่มในสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์แต่ละชนิด นาน 30 นาที พบว่า เอนไซม์สกัดจากไอโซเลท ID2R1P1 สามารถย่อยใบอ้อยและต้นข้าวโพดได้ดี ขณะที่เอนไซม์สกัดจากไอโซเลท ID2R1P2 ย่อยฟางข้าวได้ดี

แม้ว่าไอโซเลท ID2R1P2 จะสามารถย่อยอาหารแข็งชนิด CMC agar และ xylan agar ได้ดีกว่าไอโซเลท ID2R1P1 แต่เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมและมีสภาวะการทำงานของเอนไซม์ที่เหมาะสม จะเห็นว่า ไอโซเลท ID2R1P1 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสได้ดีกว่าไอโซเลท ID2R1P2 นอกจากนี้เอนไซม์ที่สกัดจากไอโซเลท ID2R1P1 ยังมีกิจกรรมการทำงานที่ดีกว่าเอนไซม์สกัดจากไอโซเลท ID2R1P2 อีกด้วย

เอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจากไอโซเลท ID2R1P1 และ ID2R1P2 สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงและเป็นด่าง น่าจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมที่ใช้ความร้อนและด่างในขบวนการผลิตได้ เช่น การทำกระดาษ การฟอกย้อมผ้า เป็นต้น

## เอกสารอ้างอิง

- ประเวศ ตั้วเต็มวงศ์, จิรศักดิ์ คงเกียรติขจร, ปิยรัตน์ บุญแสง และ อธิภัทร ศรีนรคุตร. 2552. การผลิตเอทานอลจากเซลลูโลส. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.
- พรวิภา ทองมิตร, วรุฒิ จุฬาลักษณ์านุกูล และ อรทัย ขวาลภาฤทธิ์. มรป. การเพิ่มผลผลิตน้ำตาลจากขานอ้อยโดยการย่อยสลายด้วย การระเบิดด้วยไอน้ำร่วมกับกรดอะซิติก. กรุงเทพฯ : ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- มานิสา บุพตา. 2555. “การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเซลลูโลสและไซแลนเนสจากกระเพาะหมักของกระบือ.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. กรุงเทพฯ : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- รัชพล พะวงศรีรัตน์. 2553. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมไฮโดรไลเสทผักตบชวาโดยหมักน้ำแข็งน้ำแรงดันสูงเพื่อผลิตเอทานอล. นครปฐม: คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน.
- วิมลทิพย์ ไตรปัญญา จักรกฤษณ์ เตชะอภัยคุณ กนก รัตนะกนกชัย และ คิน เลย์ คู. 2550. การย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรโดยใช้เอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติกและเซลลูโลสติกจาก *Bacillus sp.* สายพันธุ์ TW-1. หน้า 85-92. ใน เรื่องเติมการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45: สาขาวิทยาศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- เวสารัช สุนทรชัยบูรณ์, อรอนงค์ อินทร์ตา, สุทธิเดช ปรีชารัมย์ และ รัชพล พะวงศรีรัตน์. 2555. “ การผลิตเอทานอลจากใบตองในถังหมักแบบแพคเบดด้วยเชื้อยีสต์ *Candida shehatae* TISTR 5843 ที่ถูกตรึงรูปบนซังข้าวโพด.” คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นครปฐม.
- ศิริประภา คลังทอง และ ศิริวิไล อนุกุลประชา. 2546. “ การอบแห้งใบหอมสับแบบฟลูอิดาเซชันร่วมกับคลื่นไมโครเวฟ.ภาควิชาวิศวกรรมเกษตรและอาหาร.” วิทยานิพนธ์ วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต. คณะวิศวกรรมและ อุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- สมชาติ โสภณธนฤทธิ์. 2540. การอบแห้งเมล็ดธัญพืช. คณะ พลังงานและวัสดุ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- สำนักงานคณะกรรมการนโยบายพลังงานแห่งชาติ. 2542 . พลังงาน และทางเลือกการใช้เชื้อเพลิงของประเทศไทย. [Online]. Available: <http://www.eppo.go.th/doc/doc-AlterFuel.html>. 7/7/2013.
- กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2552. ศักยภาพชีวมวลในประเทศไทย. พลังงานชีวมวล. พลังงานทดแทน. คลังความรู้. กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน (พพ.) กระทรวงพลังงาน. เข้าถึงได้ที่ <http://www.dede.go.th/dede/>.
- กุศมา แก้วอินทะจักร์ คิน เลย์ คู และ กนก รัตนะกนกชัย. 2549. การย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรโดย cellulosome-like multienzyme complex จาก *Bacillus circulans* B-6. ใน เรื่องเติมการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44: สาขาวิทยาศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 100-108.

- ขวัญชนก จันทรสว่าง. 2544. การย่อยสลายโมเลกุลของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรโดยกระบวนการฉายรังสีแกมมาพร้อมกับโซเดียมไฮดรอกไซด์/ยูเรีย. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. บัณฑิตวิทยาลัย. 97 หน้า.
- ชมพูนุช หาญนนท์วิวัฒน์. 2547. การผลิตน้ำตาลจากการย่อยสลายโมเลกุลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยการฉายรังสีแกมมาพร้อมกับกรดซัลฟูริก. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. บัณฑิตวิทยาลัย. 63 หน้า.
- พรรณทิพา ธงทอง ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ จินตนา บุณนาค และ กฤษณา ภูเจริญ. 2548. การโคลนนิ่งยีนที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการสาขาสัตว ครั้งที่ 43. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, บางเขน, กรุงเทพฯ. หน้า 138-145.
- มูลนิธิพลังงานเพื่อสิ่งแวดล้อม. 2008. ชีวมวล. เข้าถึงได้ที่ <http://www.effe.or.th/home.php>.
- วาสนี เทียงสุข. 2547. ผลของรังสีแกมมาและรังสีแกมมาพร้อมกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ไฮดรอกไซด์แคลเซียมไฮดรอกไซด์ และยูเรียต่อการย่อยสลายโมเลกุลของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรบางชนิด. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. บัณฑิตวิทยาลัย. 111 หน้า.
- ระพีพรรณ อินบ้นแก้ว. 2530. แบคทีเรียในกระเพาะหมักของโคพื้นเมืองและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส. วิทยานิพนธ์วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- สำนักเศรษฐกิจทางการเกษตร. 2553. ข้อมูลพื้นฐานเศรษฐกิจการเกษตร ปี 2553. เอกสารสถิติการเกษตร เลขที่ 416. สำนักเศรษฐกิจทางการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- สำนักบริหารจัดการกากอุตสาหกรรม. 2553. โครงการส่งเสริมการใช้ประโยชน์กากอุตสาหกรรมและลดปริมาณกากที่ต้องฝังกลบ. กรมโรงงานอุตสาหกรรม. กระทรวงอุตสาหกรรม. เข้าถึงที่ <http://csic.diw.go.th:82/tccdiw/index.php>
- ศรัณยา สติธัยมันวิวัฒน์. 2551. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก (*Bubalus bubalis*). วิทยานิพนธ์ วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. กรุงเทพมหานคร: สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- Alves-Prado, H.F., Pavezzi, F.C., Leite, R.S.R., Oliveira, V.M., Sette, L.D. and DaSilva, R. 2010. Screening and production study of microbial xylanase producers from Brazilian Cerrado. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 161:333–346.
- Bradford, M. 1976. rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254.
- Beguin P. and Aubert JP. 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 25-58.
- Carere, CR, Sparling R, Cicek, N. and Levin, DB. 2008. Third generation biofuels via direct cellulose fermentation. *International Journal of Molecular Sciences* . 9:1342–1360.
- Chandra, RP., Bura, R., Mabee WE, Berlin A, Pan X and Saddler JN. 2007 Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics?. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. 108:67–93.

- Coughlan MP, Hazlewood GP. 1993. Hemicellulose and Hemicellulases. London: Portland Press Ltd.
- Dekker RF and Richards GN. 1976. Hemicellulase: their occurrence, purification, properties and mode of action. *Adv. Carbohydr. Biochem.* 32: 277-352.
- Fen, L.T. and Lee, Y.H. 1983. Kinetics Studies of Enzymatic Hydrolysis of Insoluble Cellulose : Derivation of Mechanistic Kinetic Model. *Biotechnology and Bioengineering.* 25: 2707-2733.
- Goering, H. K. and P.J. Van Soest. 1970. Forage Fiber Analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). USDA Agricultural Handbook No. 379.
- Godliving, Y.S. M. 2009. A review on recent advances in pretreatment of lignocellulosic wastes and production of value-added products. *African Journal of Biotechnology.* 8(8):1398-1415.
- Gravitis, J., Suzuki, C.K. Zandersons, J. and Bikovens, O. 1998. "Sugar cane bagasse utilization into fiber materials and value-added chemicals by steam explosion with the zero emissions target." *Biomass & Bioenergy.* 14: 219-225.
- Gupta, R. and Lee, Y.Y. 2010. "Investigation of biomass degradation mechanism in pretreatment of switchgrass by aqueous ammonia and sodium hydroxide." *Bioresource Technology* 101: 8185–8191.
- Hertzmark, D. 1982. "State of the art lecture : Biomass. In Hertzmark, DI. US-ASEAN seminar on energy technology : biomass – coal - solar/wind - energy planning." LIPI : Asean Institute of Technology. :62-84.
- Hendricks, AT. and Zeeman, G. 2009. "Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass." *Bioresource Technology.* 100:10–18.
- Ibrahim, A.A., Nada, A. Hagemann, U. and O.A. Elseond. 1996. "Preparation of Dissolving Pulp from sugar cane bagasse and its acetylation under homogeneous solution condition." *Holzforschung.* 50: 221-225.
- Kanokratana P, Chanapan, S, Pootanakit, K and Eurwilaichitr, L. 2004. Diversity and abundance of Bacteria and Archaea in the Bor Khlueng Hot Spring in Thailand. *J. Basic. Microbiol.* 44:430–444.
- Kamra DN. 2005. Rumen microbial ecosystem. *Curr. Sci.* 89: 124–135.
- Krieg, R., Sneath, P., Stanley, J. and Williams, S. 1984. *Bergey's Manual of Syntematic Bacteriology.* 8 th ed. Baltimore, Williams and Wilkins.
- Lebo SE Jr.; Gargulak JD. and McNally TJ. 2001. Lignin. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology.* John Wiley & Sons, Inc.
- Lynd, LR., P.J. Weimer, W.H. van Zyl, and I.S. Pretorius. 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66:506-577.

- Lu WJ., Hong-Tao W., Shi-Jian Y., Zhi-Chao W. and Yong-Feng N. 2005. Isolation and characterization of mesophilic cellulose-degrading bacteria from flower stalks-vegetable waste co-composting system. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 5: 353-360.
- Martinez, J.M., Granado, J.M., D.Montane ,J. Salvado and Farriol, X. 1995. Fractionation of residual lignocellulosics by dilute acid prehydrolysis and alkaline extraction. Application to almond shells. *Rioresource Technology.* 52: 59-67.
- Miller, L.G. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry.* 31: 246-248.
- Nowroozi J., Mirzaii M. and Norouzi M. 2004. Study of *Lactobacillus* as Probiotic Bacteria. *Iranian J. Publ. Health.* 33(2): 1-7.
- Oyeleke SB and Okusanmi TA. 2008. Isolation and characterization of cellulose hydrolyzing microorganism from the rumen of ruminants. *Afr. J. Biotechnol.* 7(10): 1503-1504.
- Ratanakhanokchai, K., Kyu, K.L. and Tanticharoen, M. 1999. Purification and properties of xylan-binding endoxylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. K-1. *Applied and Environmental Microbiology.* 65: 694-697.
- Reilly, P.J. 1980. "Xylanase; Structure and Function of *Myothecium verrucaria* for fuel and chemicals." *Basic Life Sciences.* 18: 111-131.
- Rodrigues TH, Rocha MV, de Macedo GR, Gonçalves LR. 2011. Ethanol production from cashew apple bagasse: improvement of enzymatic hydrolysis by microwave-assisted alkali pretreatment. *Appl Biochem Biotechnol.* 164(6): 929-943.
- Rosgaard, L., Pedersen, S. and Meyer, AS. 2007a. Comparison of different pretreatment strategies for enzymatic hydrolysis of wheat and barley straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 143: 284-296.
- Rosgaard L, Pedersen S, Langston J, Akerhielm D., Cherry JR and Meyer AS. 2007b. Evaluation of Minimal *Trichoderma reesei* Cellulase Mixtures on Differently Pretreated Barley Straw Substrates. *Biotech. Progress.* 23(6): 1270-1276.
- Sewell GW, Aldrich HC, Williams D, Mannarell B, Wilkie A, Hespell RE, Smith PH and Ingram LO. Isolation and characterization of xylan-degrading strains of *Butyrivibrio fibrisolvens* from a napier grass-fed anaerobic digester. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(5): 1085-1090.
- Tabka , M.G., Herpoël-Gimbert, I., Monod, F., Asther, M. and Sigoillot, J.C. 2006. Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase xylanase and feruloyl esterase treatment. *Enzyme and Microbial Technology.* 39:897-902.
- U.S.DOE. 2006. Breaking the Biological Barriers to Cellulosic Ethanol: A Joint Research Agenda, DOE/SC-0095. US. Department of Energy Office of Science and Office of

- Energy Efficiency and Renewable Energy. Online available: [www.doegenomestolife.org/biofuels/](http://www.doegenomestolife.org/biofuels/).
- Ververis, C., Georghiou, K., Danielidis, D., Hatzinikolaou, D.G., Santas, P., Santas, R. and Corleti, V. 2007. "Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements." *Bioresource Technology* .98: 296–301.
- Vintila T, Dragomirescu M, Croitoriu V, Vintila C, Barbu H, Sand C. 2010a. Saccharification of lignocellulose – with reference to *Miscanthus* – using different cellulases. *Romanian Biotechnological Letters*. 15(4): 5498-5504.
- Vintila ,T., Croitoriu, V., Dragomirescu, M. and Nica, D. 2010b. "The Effects of Bioprocess Parameters on Cellulase Production with *Trichoderma viride* CMIT35." *Animal Science and Biotechnologies*. 43(1).
- Wanapat M. 2001. Swamp buffalo rumen ecology and its manipulation. *In*: Proceeding Buffalo Workshop in Vietnam. [Online] Available: <http://www.mekarn.org/procbuf/wanapat.htm>
- Wang, Z., Keshwani, D.R., Redding, A.P. and Cheng J.J. 2010. "Sodium hydroxide pretreatment and enzymatic hydrolysis of coastal Bermuda grass." *Bioresource Technology* 101: 3583–3585.
- Wong, K.K.Y. Tan, L.U.L. and Saddler, J.N. 1988. "Multiplicity of  $\beta$ -1,4-xylanase in microorganisms: Functions and applications." *Microbiology* . 52: 305- 317.

ภาคผนวก

**ภาคผนวก ก**  
**อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย**

**การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ**

1. Mineral solution (Ogimoto and Imai. 1981)

1) Mineral solution I

|            |       |    |
|------------|-------|----|
| $K_2HPO_4$ | 0.6   | g  |
| น้ำกลั่น   | 100.0 | ml |

2) Mineral solution II

|                      |       |    |
|----------------------|-------|----|
| NaCl                 | 0.1   | g  |
| $(NH_4)_2SO_4$       | 0.1   | g  |
| $KH_2PO_4$           | 0.02  | g  |
| $CaCl_2$             | 0.01  | g  |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.01  | g  |
| น้ำกลั่น             | 100.0 | ml |

แต่ละส่วนนำมาละลายใน น้ำกลั่น เก็บไว้เป็น stock solution ไว้ใช้ต่อไป

2. Rumen fluid (Ogimoto and Imai. 1981)

นำของเหลวจากกระเพาะรูเมนของกระป๋องกรองผ่านผ้าขาวบางเพื่อแยกเอาชิ้นส่วนใหญ่ออกเก็บของเหลวใส่ภาชนะพลาสติกที่มีฝาปิดสนิท เก็บในอุณหภูมิ  $-20^{\circ}C$  ที่ให้ละลายแล้วนำเข้าเครื่อง centrifuge ที่  $4^{\circ}C$  25,000 รอบ/นาที 15 นาที

3. Rumen fluid agar (Ogimoto and Imai. 1981)

|                                     |      |    |
|-------------------------------------|------|----|
| Mineral solution I                  | 7.5  | ml |
| Mineral solution II                 | 7.5  | ml |
| Resazurin, 0.1 % solution           | 0.1  | ml |
| Rumen Fluid                         | 40.0 | ml |
| Glucose                             | 0.05 | g  |
| Cellobiose                          | 0.05 | g  |
| $Na_2CO_3$ , 8 % solution           | 5.0  | ml |
| Cystein-HCl. $H_2O$ , 2.5% solution | 0.05 | g  |
| Agar                                | 2.0  | g  |
| น้ำกลั่น                            | 50.0 | ml |

นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ( $121^{\circ}C$ ) 15 นาที

4. Xylan agar

|       |      |   |
|-------|------|---|
| Xylan | 1.00 | g |
|-------|------|---|

|                                                            |       |   |
|------------------------------------------------------------|-------|---|
| รำข้าว                                                     | 5.00  | g |
| Yeast extract                                              | 1.00  | g |
| Agar                                                       | 16.00 | g |
| น้ำกลั่น                                                   | 1.0   | L |
| นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว (121 °C) 15 นาที |       |   |

#### 5. Xylan broth

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

#### 6. CMC agar

|                                 |      |   |
|---------------------------------|------|---|
| NaNO <sub>3</sub>               | 2.0  | g |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 1.0  | g |
| MgSO <sub>4</sub>               | 0.1  | g |
| KCl                             | 0.1  | g |
| CMC                             | 2.0  | g |
| Peptone                         | 0.2  | g |
| Agar                            | 17.0 | g |
| น้ำกลั่น                        | 1.0  | L |

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

#### 7. CMC broth

|                                       |     |    |
|---------------------------------------|-----|----|
| CMC                                   | 0.5 | %  |
| Peptone                               | 0.5 | %  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>       | 0.5 | %  |
| MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O | 0.5 | %  |
| Yeast extract                         | 0.5 | %  |
| น้ำกลั่น                              | 100 | ml |

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

#### 8. Dilution peptone 0.1%

|                                                            |       |    |
|------------------------------------------------------------|-------|----|
| Peptone                                                    | 1.0   | g  |
| น้ำกลั่น                                                   | 100.0 | ml |
| นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว (121 °C) 15 นาที |       |    |

## 9. Lubia-Bertani broth (LB broth)

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

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

## 10. Lubia-Bertani agar (LB agar)

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

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

## 11. Nutrient agar

|              |      |   |
|--------------|------|---|
| Beef extract | 3.0  | g |
| Peptone      | 5.0  | g |
| NaCl         | 8.0  | g |
| Agar         | 15.0 | g |
| น้ำกลั่น     | 1    | L |

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## 12. Nutrient broth

การเตรียมอาหารเหลว Nutrient broth มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับอาหารแข็ง Nutrient agar แต่ไม่เติม agar นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว (121 °C) 15 นาที

**การเตรียมสารละลายสำหรับสกัดดีเอ็นเอ**

## 1. Lysis buffer

|                                  |     |    |
|----------------------------------|-----|----|
| NaCl                             | 140 | mM |
| KCl                              | 2.7 | mM |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 10  | mM |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 1.8 | mM |

pH 7.3 เติม 1 mM PMSF ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

## 2. TE buffer 6.7% sucrose

|           |     |    |
|-----------|-----|----|
| Tris base | 40  | mM |
| EDTA      | 2   | mM |
| Sucrose   | 6.7 | %  |

นำส่วนประกอบทั้งหมดผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

## 3. 20% SDS

ชั่ง SDS 10 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 25 ml ปรับปริมาตรให้ได้ 50 ml ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

## 4. phenol: chloroform: isoamyl (25:24:1)

|            |    |    |
|------------|----|----|
| Phenol     | 25 | ml |
| Chloroform | 24 | ml |
| Isoamyl    | 1  | ml |

ผสม phenol, chloroform และ isoamyl ให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 4°C (ควรทำให้ hood)

## การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์

## 1. 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)

|                                               |       |    |
|-----------------------------------------------|-------|----|
| 3,5-dinitrosalicylic acid                     | 10.6  | g  |
| NaOH                                          | 19.8  | g  |
| Potassium sodium tartate                      | 306.0 | g  |
| Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | 8.3   | g  |
| Phenol                                        | 7.6   | ml |
| น้ำกลั่นอุ่น                                  | 1,416 | ml |

ละลาย Potassium sodium tartate ในน้ำกลั่นตามปริมาตรที่ต้องการ และจึงเติมสารละลายอื่นๆ ลง บรรจุใส่ขวดสีชาแล้วเก็บไว้ในที่มืด

## 2. 2% CMC

ผสม CMC 2 g อุ่นให้ CMC ละลายจนหมด ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 100 ml

## 3. 2% xylan

ผสม xylan 2 g อุ่นให้ xylan ละลายจนหมด ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 100 ml

## 4. สารละลายโซเดียมอะซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 3-6

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

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

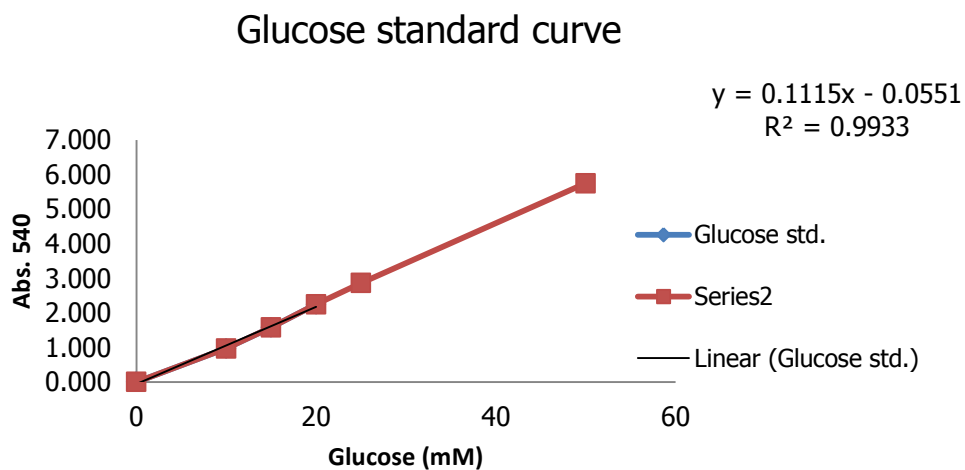
## 5. สารละลายโซเดียมอะซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 7-11

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

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

ภาคผนวก ข  
การวิเคราะห์เอนไซม์

1. กราฟมาตรฐานกลูโคส

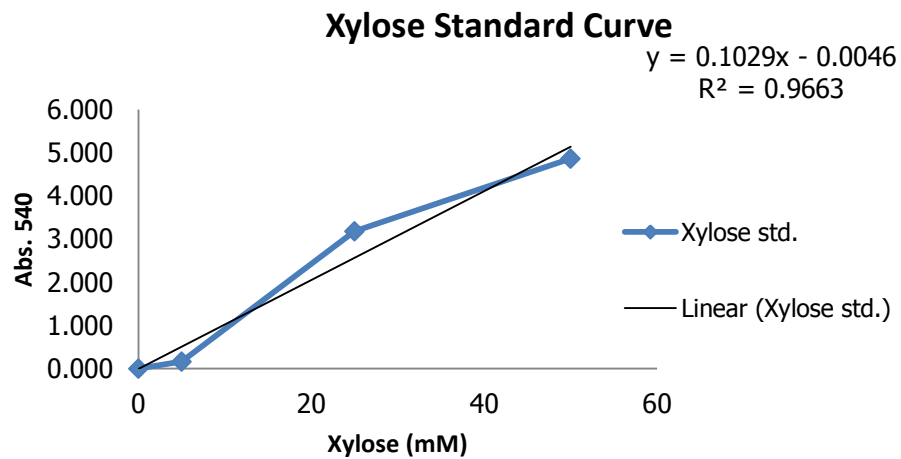


ภาพผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานกลูโคส (Glucose Standard Curve) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm

ตารางผนวกที่ ข1 ค่ามาตรฐานกลูโคสที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์

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

## 2. กราฟมาตรฐานไซโลส

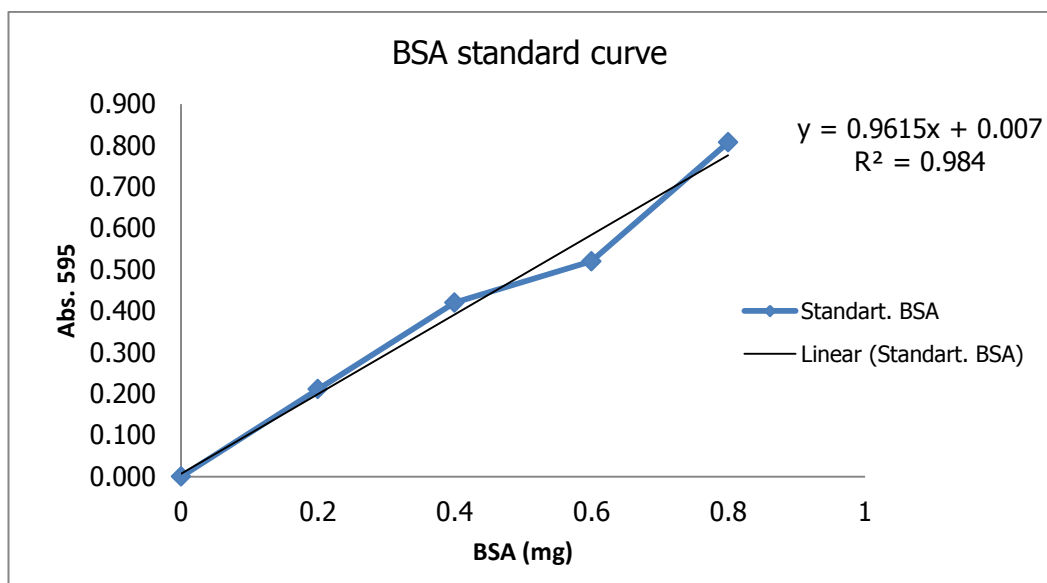


ภาพผนวกที่ ข2 แสดงกราฟมาตรฐานไซโลส (xylose standard curve) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm

ตารางผนวกที่ ข2 แสดงค่ามาตรฐานไซโลสที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์

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

### 3. กราฟมาตรฐานโปรตีน



ภาพผนวกที่ ข3 กราฟมาตรฐานโปรตีน (BSA standard curve) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm

ตารางผนวกที่ ข3 ค่ามาตรฐาน BSA ของการวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีน

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

## ประวัตินักผู้วิจัย

### หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นางกัญญา จิระเจริญรัตน์, ผศ.ดร.
2. ชื่อ-สกุล (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Kanya Jirajaroenrat, Assistant Professor Dr.
3. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3209800120117
4. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้  
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ถนนฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520  
โทรศัพท์ 02-3298519 โทรสาร 02-3298519  
E-mail kssuchee@kmitl.ac.th
5. ประวัติการศึกษา  
พ.ศ. 2532-2536 วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยมหิดล  
พ.ศ. 2541-2543 วท.ม. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์) มหาวิทยาลัยมหิดล  
พ.ศ. 2543-2547 Ph.D. (Animal Science) University of Nottingham, United Kingdom

### 6. ประสบการณ์งานวิจัย

#### ทุนวิจัย

- 1) การส่งผ่านยีนจากภายนอกไปสู่ตัวอสุจิของกระต่ายโดยวิธีการฉีดผ่านลูกอณฑะ (ทุนนักวิจัยใหม่นักเรียนทุนกระทรวงวิทยาศาสตร์ 2548) – หัวหน้าโครงการ (ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์)
- 2) การพัฒนาเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์โดยใช้ชุดไพรเมอร์รวมในการจำแนกชนิดของเนื้อสัตว์ในส่วนผสมเนื้อสัตว์ดิบและสุก (ทุนงบประมาณ พ.ศ. 2548) – หัวหน้าโครงการ (ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์)
- 3) การศึกษายีนและการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในโคพื้นเมืองไทย (ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ สกอ-สกว 2549) – นักวิจัยหลังปริญญาเอก (ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์)
- 4) การจำแนกเพศนกสวยงามด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ (ทุนงบประมาณ พ.ศ. 2550) - ผู้ร่วมวิจัย
- 5) การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคพื้นเมืองไทยในเขตภาคกลาง (ทุนวิชาการฝ่ายเกษตร สกว. 2550) – หัวหน้าโครงการ (ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์)
- 6) การศึกษาการทำงานและการแสดงออกของเอนไซม์กลุ่มคาลเพนและคาลปาสเตตินในเนื้อถั่วระหว่าง การเก็บบ่ม (ทุนงบประมาณประจำปี 2551 บัณฑิตวิทยาลัย สจล.) – หัวหน้าโครงการ (ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์)
- 7) Molecular Identification of Novel Cellulases from Buffalo (*Bubalus bubalis*) Rumen as a Potential Biocatalyst for Biofuel Production (AIT-RTG Budget-Joint Research Project, Fiscal Year 2008) – นักวิจัยหลังปริญญาเอก (ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์)
- 8) การโคลนและการแสดงออกของยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสกลุ่มที่ 9 ที่คัดเลือกมาจากจุลินทรีย์ของกระป๋อง (ทุนงบประมาณประจำปี 2553) – หัวหน้าโครงการ (โครงการวิจัยเสร็จสิ้น ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์ ภายในสิ้นเดือนมิถุนายน 2554)
- 9) การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในระบบลำไส้ของไก่โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA (ทุนวิจัยเงินรายได้ คณะเทคโนโลยีการเกษตร ประจำปี 2553) - ผู้ร่วมวิจัย

#### ผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ

- 1) Thammakarn, C., A. Punchukrang, **K. Jirajaroenrat** and K. Srikijkasemwat. 2007. Sex identification of some Psittacine birds by polymerase chain reaction. Journal of Mahanakorn Veterinary Medicine. 2(2):30-34.
- 2) **กัญญา จิระเจริญรัตน์** ฐาปนา เขมนิพิฐพนธ์ และ จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2551. การจำแนกสปีชีส์ของสัตว์ในส่วนผสมเนื้อสัตว์ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาพีซีอาร์เชิงซ้อน. วารสารวิทยาศาสตร์ มช. 36(2):162-169.
- 3) **กัญญา จิระเจริญรัตน์**. 2551. การย้ายฝากยีนผ่านทางตัวอสุจิในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 26(1): 116-123. (บทความ)
- 4) พรพิมล บุญวงศ์ ภัทรารณณ์ จางวนิชเลิศ กันยา ตันติวิสุทธิกุล จุฑารัตน์ เศรษฐกุล และ **กัญญา จิระเจริญรัตน์**. 2551. อิทธิพลของจีโนไทป์ของยีนไมโอจินินต่อลักษณะของเส้นใยกล้ามเนื้อในสุกร. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 27(1):27-33.

#### ผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

- 1) Pongjaroenkit, S., **K. Jirajaroenrat**, C. Boonchaui, U. Chanama, S. Leetachewa, L. Prapanthadara and A.J. Ketterman. 2001. Genomic organization and putative promoters of highly conserved glutathione S-transferases originating by alternative splicing in *Anopheles dirus*. Insect Biochem. Mol. Biol. 31(1):75-85.
- 2) **Jirajaroenrat, K.**, S. Pongjaroenkit, C. Krittanai, L. Prapanthadara and A.J. Ketterman. 2001. Heterologous expression and characterization of alternatively spliced glutathione S-transferases from a single *Anopheles* gene. Insect Biochem. Mol. Biol. 31(9):867-875.
- 3) Oakley, A.J., **K. Jirajaroenrat**, T. Harnnoi, A.J. Ketterman and M.C. Wilce. 2001. Crystallization of two glutathione S-transferases from an unusual gene family. Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 57(Pt 6):870-872.
- 4) Oakley, A.J., T. Harnnoi, R. Udomsinprasert, **K. Jirajaroenrat**, A.J. Ketterman, and M.C. Wilce. 2001. The crystal structures of glutathione S-transferases isozymes 1-3 and 1- 4 from *Anopheles dirus* species B. Protein Sci. 10(11):2176-2185.
- 5) Nhung N.H., Maruset L., Uengwetwanit T., Harnpicharnchai P., Pongpattanakitsote S., Tanapongpipat S., **Jirajaroenrat K.**, Rakshit S.K and Eurwilaichitr L. 2011. Identification of novel genes encoding lignocellulosic-degrading enzymes from buffalo rumen by metagenomic approach. Submission to BMC Biotech.

#### การเสนอผลงานในที่ประชุมระดับชาติ

- 1) ฐาปนา เขมนิพิฐพนธ์ และ **กัญญา จิระเจริญรัตน์**. การตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอสุกรในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลด้วยเทคนิคพีซีอาร์. หน้า 164-168. ใน การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 4. 31 มกราคม 2551. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น.
- 2) ฐาปนา เขมนิพิฐพนธ์ จุฑารัตน์ เศรษฐกุล และ **กัญญา จิระเจริญรัตน์**. การจำแนกสปีชีส์ของเนื้อสัตว์ที่ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปโดยเทคนิคปฏิกิริยาแลงก์ซ์พีซีอาร์ไพโรเมอร์เชิงซ้อน. (ซีดีรอม) ใน

การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 9. 14-15 มีนาคม 2551. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี.

#### การเสนอผลงานในที่ประชุมระดับนานาชาติ

- 1) **Jirajaroenrat, K.**, C. Denning, M. Hamshere and K.H.S. Campbell. Selection of accessible cleavage sites on alpha1,3-galactosyltransferase gene. In the 8<sup>th</sup> RNA Society Conference. 1-6 July 2003. Vienna, Austria. (abstract)
- 2) **Jirajaroenrat, K.** and C. Thammakarn. Sex identification of some pet birds by Polymerase Chain Reaction-based methods. p. 376-379. In International Conference on Integration of Science & Technology for Sustainable Development. 26-27 April 2007. Bangkok: Thailand.
- 3) **Jirajaroenrat, K.**, Y. Opatpatanakit, L. Srisuwan and J. Sethakul. Myofibrillar protein degradation over ageing period of Kampaengsaen beef. p.193-194. In Proceeding of the 53<sup>rd</sup> International Congress of Meat Science and Technology. 5-10 August 2007. Beijing, China.
- 4) Sethakul, J., Y. Opatpatanakit, R. Limsupavanich, L. Srisuwan and **K. Jirajaroenrat**. Relationship of Postmortem Troponin-T Degradation and Meat Tenderness of Beef Longissimus dorsi from Different Production Systems in Thailand. Section 6.17. In Proceeding of the 54<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology. 10-15 August 2008. Capetown, South Africa.
- 5) **Jirajaroenrat, K.**, S. Satitmanwiwat, K. Tuntivisoottikul. Genetic Diversity of Central Thailand Beef Cattle Revealed by Mitochondrial DNA Data. Session I.O.1. In The 13<sup>th</sup> Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. 22-26 September 2008. Hanoi, Vietnam.
- 6) **Jirajaroenrat, K.**, P. Boonwong and K. Tuntivisoottikul. Genetics Diversity of Thai Indigenous Beef Cattle Lines Using Microsatellites. Session I.P.12. In The 13<sup>th</sup> Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. 22-26 September 2008. Hanoi, Vietnam.
- 7) Tuntivisoottikul, K. and **K. Jirajaroenrat**. Genetic Characterization of Five Goat Breeds Using some Microsatellite DNA Markers. Session I.P.13. In The 13<sup>th</sup> Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. 22-26 September 2008. Hanoi, Vietnam.
- 8) Promthep, K., **K. Jirajaroenrat** and R. Sitthigripong. Fertility Efficiency of Bovine X-bearing Spermatozoa after Sexing by Percoll Density Gradient Centrifugation. Session I.P.14. In The 13<sup>th</sup> Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. 22-26 September 2008. Hanoi, Vietnam.
- 9) Pokathikorn, P., S Tanapongpipat. L. Eurwilaichitr and **K. Jirajareonrat**. Isolation of a Gene Encoding Beta-endoglucanase from Bovine Ruminal Bacteria Using Molecular Approach. Session I.O.3. In The 13<sup>th</sup> Animal Science Congress of the Asian-

- Australasian Association of Animal Production Societies. 22-26 September 2008. Hanoi, Vietnam.
- 10) Artchawakom, C., Y. Opatpatanakij, J. Sethakul and **K. Jirajaroenrat**. Myofibrillar Protein Profiles of Kampaengsaen Beef and Thai Native Beef During Aging Period. Session II.P.5. In The 13<sup>th</sup> Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. 22-26 September 2008. Hanoi, Vietnam.
  - 11) Satitmanwivat, S., T. Thongaram, L. Eurwilaichitr and **K. Jirajaroenrat**. Genetic Diversity of Bacterial Population in Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*) Rumen. Session I.O.2. In the 13<sup>th</sup> Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. 22-26 September 2008. Hanoi, Vietnam.
  - 12) **Jirajaroenrat, K.**, W. Sathitkowitchai, Y. Opatpatanakit. Evidence of cellulase diversity in rumen of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). p. 208-215. In Proceeding of the 20<sup>th</sup> Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology. 14-17 October 2008. Mahasarakarm, Thailand.
  - 13) Tuntivisoottikul, K. and **K. Jirajaroenrat**. Genetic variation of goat populations raised in Bangkok using microsatellite markers. 292-298. In Proceeding of the 20<sup>th</sup> Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology. 14-17 October 2008. Mahasarakarm, Thailand.
  - 14) Pimsomdaeng, O., K. Tuntivisoottikul and **K. Jirajaroenrat**. Reduction of calpain proteins in rusa deer meat during postmortem storage. 299-303. In Proceeding of the 20<sup>th</sup> Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology. 14-17 October 2008. Mahasarakarm, Thailand.
  - 15) Marusect, L., N. H. Nhung, P. Harnpichanchai, L. Eurwilaichitr and **K. Jirajaroenrat**. Identification of a gene encoding cellulase enzyme from metagenomic library of ruminal bacteria. In the 21<sup>th</sup> Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology. 24-25 September 2009. Bangkok, Thailand.
  - 16) Sathitkowitchai, W., K. Sae-Tang, S. Tanapongpipat and **K. Jirajaroenrat**. Molecular Cloning of Beta-1,4-Endoglucanase Genes from Buffalo Rumen (*Bubalus bubalis*). p.179-186. In Proceeding of the 48<sup>th</sup> Annual Conference of Kasetsart University. 3-5 Febuary 2010. Bangkok, Thailand.
  - 17) Sangsoponjit, S., W. Suphalucksana, A.F. El Sheikha, D. Montet and **K. Jirajaroenrat**. Monitoring of the microbial community structure in intestinal tract of chicken (*Gallus gallus*) by PCR-DGGE technique. In the 14<sup>th</sup> Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. 23-27 August 2010. Pingtung, Taiwan.
  - 20) Pimsomdaeng, O., K. Tuntivisoottikul and **K. Jirajaroenrat**. Postmortem Proteolysis of Longissimus Muscle Proteins in Rusa Deer (*Cervus timorensis*). In the 14<sup>th</sup>

- Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. 23-27 August 2010. Pingtung, Taiwan.
- 21) Suphalucksana, W., S. Kongsan, S. Sangsoponjit and **K. Jirajaroenrat**. Improvement of the Nutritional Value of Guinea Grass Silage by Addition of Lead Tree and Groundnut. In the 14<sup>th</sup> Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. 23-27 August 2010. Pingtung, Taiwan.
  - 22) Namkul, K., D. Boonkusol, **K. Jirajaroenrat** and A. Jarernpornnipat. Ovarian Developmental Stage Indices and Haemolymph Protein Change of Mud Crabs: *Scylla olivacea* and *Scylla paramamosain*. In the 14<sup>th</sup> Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. 23-27 August 2010. Pingtung, Taiwan.
  - 23) Pinmongkongune, D., S. Netrphan and **K. Jirajaroenrat**. Molecular Cloning of Bacterial Beta-glucosidase Genes from Buffalo Ruminant Fluid Using Metagenomic Approach. P5-02. In the 16<sup>th</sup> Asian Agricultural Symposium "Sufficiency Agriculture" and 1<sup>st</sup> International Symposium on Agricultural Technology. 25-27 August 2010. Bangkok, Thailand.
  - 24) Yaowarat, N., **K. Jirajaroenrat** and K. Srikitkasemwat. Molecular Cloning of Family 9 Cellulase Genes from Metagenomic DNA in Buffalo Ruminant Fluid. P5-04. In the 16<sup>th</sup> Asian Agricultural Symposium "Sufficiency Agriculture" and 1<sup>st</sup> International Symposium on Agricultural Technology. 25-27 August 2010. Bangkok, Thailand.
  - 25) Srimoon, O., **K. Jirajaroenrat** and K. Srikitkasemwat. Molecular Cloning of a Family 48 Cellulase Gene from Buffalo Rumen. P5-03. In the 16<sup>th</sup> Asian Agricultural Symposium "Sufficiency Agriculture" and 1<sup>st</sup> International Symposium on Agricultural Technology. 25-27 August 2010. Bangkok, Thailand.

## ผู้ร่วมวิจัย 1

1. ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นางกนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์, ผศ.ดร.
2. ชื่อ-สกุล (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Kanokrat Srikitsasemwat, Assistant Professor Dr.
3. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3400500802298
4. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้  
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ถนนฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520  
โทรศัพท์ 02-3298519 โทรสาร 02-3298519  
E-mail kskanokr@kmitl.ac.th
5. ประวัติการศึกษา  
พ.ศ. 2533-2537 วท.บ. เทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
พ.ศ. 2537-2540 วท.ม. เทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
พ.ศ. 2544-2549 ปรัช.ด. เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
6. ประสบการณ์งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และ/หรือที่ผ่านมา ทั้งภายในและภายนอกประเทศ

## ทุนวิจัย

- 1 การจำแนกเพศนกสวองงามด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์(ทุนวิจัยเงินรายได้ คณะเทคโนโลยีการเกษตร พ.ศ. 2550) – หัวหน้าโครงการ(ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์)
- 2 การใช้ประโยชน์จากกากนมถั่วเหลืองในอาหารไก่เนื้อ (ทุนงบประมาณ พ.ศ. 2552) – หัวหน้าโครงการ (โครงการวิจัยเสร็จสิ้น ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์ภายในสิ้นเดือนมิถุนายน 2554)
- 3 การพัฒนาเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ในการจำแนกเพศนกแก้วปากขอ (ทุนงบประมาณ พ.ศ. 2552) – ผู้ร่วมวิจัย (ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์)

## ผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ

- กนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์.** 2551. การตรวจแยกเพศนกสวองงามจากความแตกต่างของยีน CHD ด้วยเทคนิค PCR. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 26(2): 91-96.
- กนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์.** 2551. สเต็มเซลล์ สัตว์แพทย์มหานครสาร. 3( 1) : 67-72.
- สุชีพ สุขสุแพทย์ อนุชา แสงโสภณ และกนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์.** 2542. อิทธิพลของน้ำหนักไข่ต่อการฟักออกของลูกนกกระจอกเทศ วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 17(2): 42-47.
- อนุชา แสงโสภณ รณชัย สิทธิไกรพงษ์ พงศ์ศักดิ์ ศรีธเนศชัย และ กนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์.** 2543. ผลกระทบของสมุนไพรฟ้าทะลายโจรต่อสมรรถภาพของไก่เนื้อและไก่พื้นเมืองลูกผสมทางการค้า. ว.พระจอมเกล้าลาดกระบัง 8(2) : 15-21.
- อนุชา แสงโสภณ วิชัย ศุภลักษณ์ และกนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์.** 2544. ชนิดของเสียในถาดเกิดลูกไก่และวิธีการให้ความร้อนต่อองค์ประกอบทางเคมีในของเสีย. ว.พระจอมเกล้าลาดกระบัง 9(1) : 25-30.
- อนุชา แสงโสภณ วิชัย ศุภลักษณ์ และกนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์.** ชนิดและวิธีการให้ความร้อนต่อส่วนประกอบทางเคมีในของเสียจากการฟักไข่. ว.พระจอมเกล้าลาดกระบัง 8(3) : 25-30.
- Srikitsasemwat, K., S. Chantakru, S. Wongnakpet , K. Siripattarapavat and T. Sirinarumitr.** 2005. Production of Recombinant Porcine Interleukin-2 (IL-2). J Kasetart Veterinarians. 15(3) : 137-145

- Srikijkasemwat, K., S. Vihokto, S. Chantakru, S. Wongnakpet and T. Sirinarumitr.** 2005. Production of Recombinant Non-Structural Protein 3ABC of Foot and Mouth Disease Virus (FMDV) Serotype O Using Baculovirus-Insect Cell Expression System. *J Kasetsart Veterinarians*. 15(3): 126-136
- Thammakarn, C., A. Punchukrang, K. Jirajoenrat and **K. Srikijkasemwat.** 2007. Sex identification of some Psittacine birds by polymerase chain reaction. *Journal of Mahanakorn Veterinary Medicine*. 2(2):30-34.

#### การเสนอผลงานในที่ประชุมระดับชาติ

- กนกรัตน์ ป้องประทุม.** 2542. การควบคุมการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* 102566 โดยใช้สารกันเสียบางชนิด. ใน : รายงานผลการวิจัย การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37 วันที่ 3-5 กุมภาพันธ์ 2542. หน้า 223.
- กนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์** กรรณิการ์ ศิริภัทรประวัติ ศิริรักษ์ จันทครุ ศิริชัย วงษ์นาคเพชร และ อีระพล ศิริ นฤมิตร. 2548. การผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ อินเตอร์ลิวคิน 2 ในเซลล์แมลง. ใน : รายงานผลการวิจัย การประชุมทางวิชาการของสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ครั้งที่ 31 วันที่ 2-4 พฤษภาคม 2548. หน้า 28.
- เยาวลักษณ์ คำจันทร์ กนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์ อลงกต บุญสูงเนิน สุขสันต์ ฉ่ำสิงห์ และปรีดา เลิศวัชรสารกุล. 2552. การจำแนก สายพันธุ์ย่อยของเชื้อ *Haemophilus parasuis* ที่คัดแยกได้จากสุกรในประเทศไทย. ใน : รายงานผลการวิจัยการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47 กรุงเทพฯ วันที่ 17-20 มี.ค. 2552. หน้า 148-155.
- Srikijkasemwat, K., T. Siriinarumitr and K. Siripattarapavat.** Cloning and Expression of Recombinant Porcine Interleukin-2 (IL-2) in Baculovirus, p. 68. *In* AgBiotech Graduate Conference I, 18-19 March 2004. Bangkok, Thailand.

#### การเสนอผลงานในที่ประชุมระดับนานาชาติ

- Srikitkasemwat, K., D. Thanaboripat and V. Ruangrattanamete.** 2000. Control of growth and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* in corn by salt, p. 111. *In* Proceedings Of Asian Mycological Congress 2000, 9-13 July 2000. Hong Kong Sar, China.
- Srikijkasemwat, K., T. Siriinarumitr, K. Siripattarapavat and D. Surangkul.** Molecular Cloning and Expression of recombinant Porcine Interleukin-2 (IL-2) in Baculovirus p. 145. *In* The Fifth Princess Chulabhorn International Science Congress “Evolving Genetics and Its Global Impact”, 16-20 August. 2004. Bangkok, Thailand.
- Yaowarat, N., K. Jirajoenrat and **K. Srikitkasemwat.** Molecular Cloning of Family 9 Cellulase Genes from Metagenomic DNA in Buffalo Ruminant Fluid. P5-04. In the 16<sup>th</sup> Asian Agricultural Symposium “Sufficiency Agriculture” and 1<sup>st</sup> International Symposium on Agricultural Technology. 25-27 August 2010. Bangkok, Thailand.
- Srimoon, O., K. Jirajoenrat and **K. Srikitkasemwat.** Molecular Cloning of a Family 48 Cellulase Gene from Buffalo Rumen. P5-03. In the 16<sup>th</sup> Asian Agricultural Symposium “Sufficiency Agriculture” and 1<sup>st</sup> International Symposium on Agricultural Technology. 25-27 August 2010. Bangkok, Thailand.

## ผู้ร่วมวิจัย 2

1. ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นายกานต์ สุขสุแพทย์, รศ.ดร.

ชื่อ-สกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Kan Suksupath, Associate Professor Dr.

2. เลขหมายประจำตัวประชาชน 3 1409 00264 98 9

3. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ถนนฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

โทรศัพท์ 02-3298519 โทรสาร 02-3298519

E-mail kssuchee@kmitl.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2516-2520 วท.บ. เกษตรศาสตร์(สัตวบาล) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2520-2524 วท.ม. เกษตรศาสตร์(สัตวบาล) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2533-2537 Ph.D Agriculture (Poultry nutrition) The University of Sydney, Australia

5. ประสบการณ์งานวิจัย

### ผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ

- 1). สุชีพ สุขสุแพทย์. 2530. การศึกษาอุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์และการฟักออกเป็นตัว ของไข่ห่านจากการฟักด้วยวิธีธรรมชาติ. วารสารแก่นเกษตร. ปีที่ 15 หน้า 21-26.
- 2). ศรีสกุล วรจันทรา และสุชีพ สุขสุแพทย์. 2530. อิทธิพลของการเก็บรักษาไข่ฟักต่อเปอร์เซ็นต์การฟักออกของนกกกระทาญี่ปุ่น. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า ปีที่ 5 เล่มที่ 1 หน้า 18-27.
- 3). สุชีพ สุขสุแพทย์ และศรีสกุล วรจันทรา. 2531. วิธีการควบคุมน้ำหนักตัวเป็ดรุ่นไข่ วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. ปีที่ 6 เล่มที่ 3 หน้า 8-27.
- 4). สุชีพ สุขสุแพทย์ และทรงศักดิ์ ตันพิพัฒน์. 2531. การใช้กากเต้าหู้เป็นอาหารเสริมโปรตีนเพื่อลดต้นทุนการผลิตเป็ดเนื้อ. วารสารแก่นเกษตร ปีที่ 16 เล่มที่ 4 หน้า 190-199.
- 5). สุชีพ สุขสุแพทย์, ทรงศักดิ์ ตันพิพัฒน์ และ รณชัย สิทธิไกรพงษ์. 2533. การใช้มันสำปะหลังหมักโปรตีนสูงในอาหารเป็ดเนื้อ. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า ปีที่ 8 เล่มที่ 3 หน้า 9-17.
- 6). สุชีพ สุขสุแพทย์ และทรงศักดิ์ ตันพิพัฒน์. 2534. การศึกษาวิธีการเก็บรักษาไข่ห่านก่อนฟักและใช้การพ่นน้ำอุ่นเพื่อเพิ่มการฟักออก. วารสารแก่นเกษตร ปีที่ 19 เล่มที่ 5 หน้า 274-279.
- 7). สุชีพ สุขสุแพทย์ และทรงศักดิ์ ตันพิพัฒน์. 2534. การปรับปรุงวิธีการเก็บรักษาไข่นกกกระทาก่อนฟัก. วารสารแก่นเกษตร. ปีที่ 19 เล่มที่ 3. หน้า 156-162.
- 8). สุชีพ สุขสุแพทย์ และ Bryden. W.L. 2537. ผลของเชื้อบิด *Eimeria* spp และสารพิษ cyclopiazonic acid ในไก่กระทง. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. ปีที่ 12 เล่มที่ 2 หน้า 1-14.
- 9). สุชีพ สุขสุแพทย์. 2537. ผลการจำกัดอาหารไก่เนื้อระยะเล็ก. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า ปีที่ 12 เล่มที่ 3 หน้า 37-45.
- 10). สุชีพ สุขสุแพทย์ อนุชา แสงโสภณ และอาวุธ ตันโช 2541. การฟักไข่นกกกระทาเทศเป็นการค้า วารสารเกษตรพระจอมเกล้า ปีที่ 16 เล่ม 2 หน้า 37-43.
- 11). สุชีพ สุขสุแพทย์ อนุชา แสงโสภณ และกนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์ 2542 อิทธิพลของน้ำหนักไข่ต่อการฟักออกของลูกนกกกระทาเทศ วารสารเกษตรพระจอมเกล้า ปีที่ 17 เล่ม 2 หน้า 42-47.

- 12). สุชีพ สุขสุแพทย์ และ พานิช แสนโภชน 2543. การศึกษาต้นทุนการผลิตไก่ฟ้า วารสารสัตว์ป่าเมืองไทย 8(1) 2543 หน้า 96-103.
- 13). อาทิตย์ พลายมาศ สุชีพ สุขสุแพทย์ และศุภรัตน์ โฆษิตเจริญกุล 2543. การใช้สารเคมีควบคุมการสร้างอะฟลาทอกซินในข้าวโพด วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง ปีที่ 8 ฉบับที่ 1 หน้า 36-41.

ผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

- 1). Cole, R.J., Taylor, D.J., Cole, E.A., **Suksupath, S.**, McDowell, G.H. and Bryden, W.L. 1988. Cyclopiazonic acid toxicity in lactating ewe and laying hen. *Proc.Nutr.Soc. Aust.*, 13:134.
- 2). **Suksupath, S.**, Cole, E.A., Cole, R.J. and Bryden, W.L. 1989. Toxicity of cyclopiazonic acid in the laying hens. *Proc. Aust. Poult.Sci.Symp.*, 2:94.
- 3). Dorner, J.W., Cole, R.J., Taylor, D.J., **Suksupath, S.** McDowell, G.H. and Bryden, W.L. 1990. Cyclopiazonic acid residues in ewe milk and chicken eggs. *Proc 10th AOAC Meeting*. P. 229.
- 4). **Suksupath, S.**, Siriwan, P., Cole, R.J. and Bryden, W.L. 1990. Effect of cyclopiazonic acid on nutrient utilisation and endogenous amino acids secretion in broiler chickens. *Proc.Nutr.Soc.Aust.*, 15:54.
- 5). **Suksupath, S.**, Mulley, R.C. and Bryden, W.L. 1990. Toxicity of cyclopiazonic acid in mature male chickens. *Proc.Aust. Poult.Sci.Symp.*, 3:120.
- 6). **Suksupath, S.**, Dorner, J.W., Cole, R.J. and Bryden, W.L. 1991. Deposition of cyclopiazonic acid in eggs. *Proc. Aust.Poult.Sci.Symp.*, 4:70.
- 7). **Suksupath, S.**, Fraser, D.R., Cole, R.J. and Bryden, W.L. 1991. Effect of cyclopiazonic acid on calcium content in plasma, egg shell, uterine fluid and egg shell gland of laying hens. *Proc.Aust.Poult.Sci.Symp.*, 4:71.
- 8). **Suksupath, S.**, Elrington, D.J., Dorner, J.W., Cole, R.J. and Bryden, W.L.1991. Effect and fate of cyclopiazonic acid in poultry and sheep. *Proc.International Conference on "Fungi and Mycotoxins in Stored Products"*. p. 236-237. Bangkok, Thailand.
- 9). **Suksupath, S.**, Dorner, J.W., Cole, R.J. and Bryden, W.L. 1992 Residues of the mycotoxin cyclopiazonic acid in eggs and tissues of laying hens. *Proc.Nutr.Soc.Aust.*, 17:141.
- 10). **Suksupath, S.**, Mollah, Y., Cole, R.J. and Bryden, W.L. 1992. Uric acid excretion from birds dosed with cyclopiazonic acid. *Proc.Aust.Poult.Sci.Symp.*, 5:146.
- 11). **Suksupath, S.**, Cole, R.J. and Bryden, W.L. 1993. Effect of cyclopiazonic acid on fertility, hatchability and progeny performance of laying hens. *Proc.Aust.Poult.Sci.Symp.*, 6:71.
- 12). **Suksupath, S.**, Muir, W.I., Cole, R.J. and Bryden, W.L. 1993. Effect of *Eimeria* spp. infection and cyclopiazonic acid in broiler chickens. *Proc.Aust.Poult.Sci.Symp.*, 6:87.
- 13). **Suksupath, S.**, Dorner, J.W., Cole, R.J. and Bryden, W.L. 1993 Clearance of cyclopiazonic acid by laying hens. *Proc.Aust. Poult.Sci.Symp.*, 6:86.
- 14). **Suksupath, S.** and Bryden, W.L. 1993. Effect of cyclopiazonic acid in laying hens. *Proc. X<sup>th</sup> International Congress of the World Veterinary Poultry Association*. Sydney, Australia, p 168.

- 15). **Suksupath, S.** and Bryden, W.L. 1994. Influence of dietary zeolites on cyclopiazonic acid toxicity and toxin deposition in laying hens. *Proc. 2<sup>nd</sup> Asian Conference on Food Safety*. Bangkok, Thailand.
- 16). **Brackpool, C.E.**, Robert, J.R., Hughes, J.R. Bryden, W.L. and **Suksupath, S.** 1994. Comparison of egg shell ultrastructure from eggs laid by hens either exposed to heat stress or exposed to the mycotoxin, cyclopiazonic acid. *Proc. Aust. Poult. Sci. Symp.* 6:59-63.
- 17). Dorner, J.W., Cole, R.J., Elrington, D.J., **Suksupath, S.**, McDowell, G.H. and Bryden, W.L. 1994. Cyclopiazonic acid residues in milk and egg. *J. Agri. Food Chem.* 42:1516-1518.
- 18). Kulcharoen, N. and **Suksupath, S.** 2003. The metabolisable energy of rice by-products. *Asian Poultry Magazine*, Jan/Feb : p. 44-47.
- 19). Triratapiwan, T., **Suksupath, S.**, Tuntivisoottikul, K. and Sitthigripong, R. 2004. A study on genetic diversity of some Thai indigenous chicken lines by microsatellites. *Proc. of the 1<sup>st</sup> KMITL International Conference on Integration of Science and Technology for Sustainable Development*, Bangkok, Thailand. 25-26 August 2004 Vol. 2 : 390-393.
- 20). Chaitongkong, J., **Suksupath, S.**, Tuntivisoottikul, K. and Sitthigripong, R. 2004. Growth hormone gene polymorphisms in local Thai chickens. *Proc. of the 1<sup>st</sup> KMITL International Conference on Integration of Science and Technology for Sustainable Development*, Bangkok, Thailand. 25-26 August 2004 Vol. 2 : 394-397.
- 21). Vorachantra, S., **Suksupath, S.** and Wijitrothai, N. 2004. Studies on chemical composition and quality grade of protein feedstuffs 1). Fishmeal. Proceeding of International Symposium on Animal and Plant Production for Food and Environmental Security, 9-11 August 2004, Chaophaya Park Hotel, Bangkok, Thailand.

#### การเสนอผลงานในที่ประชุมระดับชาติ

- 1) **สุชีพ สุขสุแพทย์ และทรงศักดิ์ ตันพิพัฒน์.** 2530. การใช้มูลกระต่ายเป็นอาหารไก่กระตาง. เอกสารการประชุมทางวิชาการเรื่อง การใช้ประโยชน์จากกากของเสียและทรัพยากรเหลือใช้. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 17-18 มิถุนายน 2530.
- 2) **สุชีพ สุขสุแพทย์ และทรงศักดิ์ ตันพิพัฒน์.** 2530. การศึกษาระดับอนุภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ที่เหมาะสมในการฟักไข่ห่าน. รายงานผลงานวิจัยเสนอสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 3). **สุชีพ สุขสุแพทย์** 2538. การให้อาหารเลือกกินอิสระในไก่ไข่. เอกสารประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 33. 3-5 กุมภาพันธ์ 2538.
- 4). **สุชีพ สุขสุแพทย์ พานิช แสนโกชน และจรรยา คงฤทธิ์.** 2539. ความต้องการโปรตีนและพลังงานสำหรับไก่ฟ้าหลังขาวระยะเล็กและระยะเจริญเติบโต. เอกสารประกอบการสัมมนาเรื่องสัตว์ป่าเมืองไทยครั้งที่ 17 คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 19-20 ธันวาคม 2539. และตีพิมพ์ในวารสารสัตว์ป่าเมืองไทย 5(2) 2539 หน้า 89-99.
- 5). **สุชีพ สุขสุแพทย์ ศุภรัตน์ โฆษิตเจริญกุล และอาทิตย์ พลายมาศ.** 2540. ผลการใช้ข้าวโพดเก็บรักษาด้วยสารเคมีควบคุมอะฟลาทอกซินในนกกกระทุงญี่ปุ่น. เอกสารประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35. 3-5 กุมภาพันธ์ 2540.

- 6). ณหทัย วิจิตโรทัย สุชีพ สุขสุแพทย์ และจรรยา คงฤทธิ์. 2540. การใช้กากถั่วเขียวจากโรงงานวันเส้นในอาหารนกกระทา. เอกสารประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35. 3-5 กุมภาพันธ์ 2540.
- 7). อาวุธ ต้นโซ และสุชีพ สุขสุแพทย์ 2540. ผลของการเสริมกรดฮิวมิกต่อลักษณะการไข่ของแม่ไก่ไข่ที่อายุ 28-51 สัปดาห์. เอกสารประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35. 3-5 กุมภาพันธ์ 2540.
- 8). นันทนิจ กุลเจริญ และสุชีพ สุขสุแพทย์ 2540. เทคนิคการประเมินค่าพลังงานใช้ประโยชน์ของวัตถุดิบอาหารสัตว์ปีก. เอกสารประชุมทางวิชาการ ม.อ. ครั้งที่ 1 28-30 กรกฎาคม 2540 มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
- 9). สุชีพ สุขสุแพทย์ 2540. การประเมินค่าพลังงานใช้ประโยชน์ของรำสกัดในสัตว์ปีก เอกสารประชุมทางวิชาการ ม.อ. ครั้งที่ 1 28-30 กรกฎาคม 2540 มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
- 10). สุชีพ สุขสุแพทย์ พานิช แสนโภชน และจรรยา คงฤทธิ์ 2541. การศึกษาระดับความต้องการโปรตีนและพลังงานสำหรับไก่ฟ้าหลังขาวธรรมดา เอกสารประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 36. 3-5 กุมภาพันธ์ 2541
- 11). สุชีพ สุขสุแพทย์ และ พานิช แสนโภชน 2541. การศึกษาชนิดของอาหารและการกินอาหารของไก่ฟ้า การเสนอผลงานวิชาการในการสัมมนาเรื่อง สัตว์ป่าเมืองไทย ครั้งที่ 19 วันที่ 22-24 ธันวาคม 2541 ณ อาคารสารนิเทศ 50 ปี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- 12). สุชีพ สุขสุแพทย์ และ พานิช แสนโภชน 2542. การศึกษาความต้องการโภชนะสำหรับไก่ฟ้าโดยให้อาหารแบบเลือกกินอิสระ เอกสารประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37. 3-5 กุมภาพันธ์ 2542
- 13). สุชีพ สุขสุแพทย์ และ อนุชา แสงโสภณ 2542. ผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาไข่ก่อนฟักต่อเปอร์เซ็นต์การฟักออกของลูกนกกระทาจอกเทศ เอกสารประชุมทางวิชาการ 30 ปีเกษตรเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 24-25 มิถุนายน 2542 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.
- 14). สุชีพ สุขสุแพทย์ และ เทพกร ช่วยสงคราม. 2546. พลังงานใช้ประโยชน์ของกากปาล์มน้ำมันในสัตว์ปีก. เอกสารประชุมทางวิชาการ(C-1/31) การประชุมและแสดงผลงานทางวิชาการพระจอมเกล้าลาดกระบัง ครั้งที่ 1 25 สิงหาคม 2546 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.
- 15). สุชีพ สุขสุแพทย์ รณชัย สิทธิ ไกรพงษ์ และ ทศนีย์ ตรัยรัตน์อภิวัน 2547. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองไทยจำนวน 5 สายพันธุ์โดยใช้เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์. รายงานผลงานวิจัยเสนอคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.
- 16). สุชีพ สุขสุแพทย์ รณชัย สิทธิ ไกรพงษ์ และ เจษฎาพร ไชยทองคง 2547. การศึกษาสมรรถภาพการผลิตในไก่คอปเปลือกที่เลี้ยงในสภาวะอุณหภูมิสูง. รายงานผลงานวิจัยเสนอคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.
- 17). ศรีสกุล วรจัทธา สุชีพ สุขสุแพทย์ และณหทัย วิจิตโรทัย. 2547. การศึกษาส่วนประกอบของกรดอะมิโนและค่าการย่อยได้จริงโดยสัตว์ปีกของวัตถุดิบแหล่งพลังงาน. เอกสารการประชุมสัมมนาวิชาการเกษตรแห่งชาติ ประจำปี 2547 สาขาสัตวศาสตร์/สัตว์บาล 27-28 มกราคม 2547 ณ. โรงแรมโซฟิเทล ราชาออคิต จังหวัดขอนแก่น
- 18). ศรีสกุล วรจัทธา สุชีพ สุขสุแพทย์ และณหทัย วิจิตโรทัย. 2547. ส่วนประกอบทางเคมีและชั้นคุณภาพของวัตถุดิบอาหารสัตว์แหล่งพลังงาน. เอกสารการประชุมสัมมนาวิชาการเกษตรแห่งชาติ ประจำปี 2547 สาขาสัตวศาสตร์/สัตว์บาล 27-28 มกราคม 2547 ณ. โรงแรมโซฟิเทล ราชาออคิต จังหวัดขอนแก่น
- 19). ศรีสกุล วรจัทธา สุชีพ สุขสุแพทย์ และณหทัย วิจิตโรทัย. 2547. การศึกษาส่วนประกอบของกรดอะมิโนและค่าการย่อยได้โดยเปปซินในวัตถุดิบอาหารสัตว์แหล่งพลังงาน. เอกสารการประชุมสัมมนาวิชาการ

- เกษตรแห่งชาติ ประจำปี 2547 สาขาสัตวศาสตร์/สัตวบาล 27-28 มกราคม 2547 ณ. โรงแรมโซฟิเทล ราชาออคิต จังหวัดขอนแก่น
- 20). ศรีสกุล วรจัทธา **สุชีพ สุขสุแพทย์** และณัทชัย วิจิตโรทัย. 2547. ความสัมพันธ์ของค่าการย่อยได้จริงในสัตว์ปีกกับค่าการย่อยได้โดยเปปซินของกรดอะมิโนในวัตถุดิบแหล่งพลังงาน. เอกสารการประชุมสัมมนาวิชาการเกษตรแห่งชาติ ประจำปี 2547 สาขาสัตวศาสตร์/สัตวบาล 27-28 มกราคม 2547 ณ. โรงแรมโซฟิเทล ราชาออคิต จังหวัดขอนแก่น
  - 21). ศรีสกุล วรจัทธา **สุชีพ สุขสุแพทย์** และณัทชัย วิจิตโรทัย. 2548. การศึกษาค่าการย่อยได้ของกรดอะมิโนโดยสัตว์ปีกของวัตถุดิบแหล่งโปรตีน 1. ปลาป่น การประชุมสัมมนาวิชาการสัตวศาสตร์ 14-15 พฤศจิกายน 2548 ณ. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
  - 22). **สุชีพ สุขสุแพทย์** รณชัย สิทธิ ไกรพงษ์ และ เจษฎาพร ไชยทองคง 2548. การศึกษาสมรรถภาพการผลิตในไก่คอเปลือยที่เลี้ยงในสภาวะอุณหภูมิสูง. การประชุมสัมมนาวิชาการสัตวศาสตร์ 14-15 พฤศจิกายน 2548 ณ. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
  - 23). **สุชีพ สุขสุแพทย์** และพานิช แสนโกชน์. 2549. การเพิ่มความยาวแสงในไก่ฟ้าหลังขาวในช่วงฤดูผสมพันธุ์. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ปีที่ 2 ฉบับที่ 1 มกราคม-มิถุนายน 2549
  - 24). จารุณี พรหมมานนท์ จรรยา คงฤทธิ์ และ**สุชีพ สุขสุแพทย์**. 2549. การศึกษาการย่อยได้และการใช้ประโยชน์ของอาหารไก่ฟ้า. การประชุมสัมมนาวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 2 24 มกราคม 2549 ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ร่วมกับ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (โปสเตอร์).
  - 25). ศรีสกุล วรจัทธา **สุชีพ สุขสุแพทย์** ณัทชัย วิจิตโรทัย และจรรยา คงฤทธิ์. 2549. การศึกษาส่วนประกอบทางเคมีและชั้นคุณภาพในวัตถุดิบอาหารสัตว์แหล่งโปรตีน 2. กากถั่วเหลือง การประชุมสัมมนาวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 2 24 มกราคม 2549 ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ร่วมกับ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (โปสเตอร์).
  - 26). ศรีสกุล วรจัทธา **สุชีพ สุขสุแพทย์** ณัทชัย วิจิตโรทัย และจรรยา คงฤทธิ์. 2549. การศึกษาค่าการย่อยได้ของกรดอะมิโนโดยสัตว์ปีกของวัตถุดิบแหล่งโปรตีน 2. กากถั่วเหลือง การประชุมสัมมนาวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 2 24 มกราคม 2549 ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ร่วมกับ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (โปสเตอร์).
  - 27). **สุชีพ สุขสุแพทย์** พานิช แสนโกชน์ จรรยา คงฤทธิ์ และจารุณี พรหมมานนท์. 2549. การศึกษาการย่อยได้และการใช้ประโยชน์ของอาหารไก่ฟ้า. การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 7 วันที่ 25-26 พฤษภาคม 2549 สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่ (โปสเตอร์).
  - 28). **สุชีพ สุขสุแพทย์** และพานิช แสนโกชน์. 2549. ผลการใช้หนอนนกและกรดอะมิโนสังเคราะห์ในไก่ฟ้าหลังขาวในช่วงฤดูผสมพันธุ์. การประชุมทางวิชาการ สิ่งแวดล้อมนเรศวร ครั้งที่ 2 วันที่ 28-29 มิถุนายน 2549 คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร จ. พิษณุโลก (โปสเตอร์).
  - 29). **สุชีพ สุขสุแพทย์** จรรยา คงฤทธิ์ และ จารุณี พรหมมานนท์. 2549. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ เรื่อง การศึกษาการให้โภชนาที่เหมาะสมในสัตว์ปีกที่รับอาหารแบบเลือกกิน ได้รับงบประมาณสนับสนุน เงินรายได้ปีงบประมาณ พ.ศ. 2549 ของภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สจล. งบประมาณ 50,000 บาท
  - 30). **สุชีพ สุขสุแพทย์** และจรรยา คงฤทธิ์ 2550. ผลของชนิดอาหารต่อการเจริญเติบโต การออกไปและการฟักไข่ของไก่ฟ้าหลังขาว การประชุมทางวิชาการ สิ่งแวดล้อมนเรศวร ครั้งที่ 3 วันที่ 20-21 มิถุนายน 2550 คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร จ. พิษณุโลก

- 31). จารุณี พรหมมานนท์ และ **สุชีพ สุขสุแพทย์**. 2550. ผลของระดับโปรตีนในอาหารให้แบบเลือกกินต่อการเจริญเติบโตของไก่ฟ้าหลังขาว การประชุมทางวิชาการ สิ่งแวดล้อมเรศวร ครั้งที่ 3 วันที่ 20-21 มิถุนายน 2550 คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร จ. พิษณุโลก
- 32). จารุณี พรหมมานนท์ และ **สุชีพ สุขสุแพทย์** 2550. ผลการให้อาหารแบบเลือกกินในไก่ฟ้าหลังขาวระยะเติบโต. การเสนอผลงานวิชาการในการประชุมใหญ่สามัญประจำปี พ.ศ. 2550 ของสมาคมสัตวปีกโลก สาขาประเทศไทย วันที่ 30 ตุลาคม 2550 ณ โรงแรมโซฟิเทล เซลทาราแกรนด์ กรุงเทพฯ
- 33). **สุชีพ สุขสุแพทย์** จารุณี พรหมมานนท์ และ จรรยา คงฤทธิ์ และ 2551. ผลการให้อาหารแบบเลือกกินต่อการเติบโตของไก่ฟ้าหลังขาวระยะรุ่น. การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 4 วันที่ 31 มกราคม 2551 คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (โปสเตอร์).
- 34). **กานต์ สุขสุแพทย์**,<sup>1</sup> จรรยา คงฤทธิ์ และ จารุณี พรหมมานนท์ 2551 การศึกษาความต้องการสารอาหารในสัตว์ปีกโดยวิธีให้อาหารแบบเลือกกิน การประชุมวิชาการ งานวันเกษตรแห่งชาติ ประจำปี 2551 ระหว่างวันที่ 8-10 กันยายน 2551 ณ คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก (โปสเตอร์)
- 35). **สุชีพ สุขสุแพทย์** จรรยา คงฤทธิ์ และ จารุณี พรหมมานนท์. 2551. การศึกษาการให้โภชนาที่เหมาะสมในสัตว์ปีกที่รับอาหารแบบเลือกกิน. รายงานผลงานวิจัยเสนอคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.
- 36). มัณฑนา บรรจง จรรยา คงฤทธิ์ และ **กานต์ สุขสุแพทย์** 2552. ผลการให้อาหารเลือกกินต่อการเจริญเติบโตของไก่ลูกผสมพื้นเมือง. การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 5 วันที่ 26-28 มกราคม 2552 คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (โปสเตอร์).
- 37). จรรยา คงฤทธิ์ และ **กานต์ สุขสุแพทย์** 2552. การเจริญเติบโตและซากของไก่พื้นเมืองที่ให้อาหารเลือกกิน. การประชุมสัมมนาทางวิชาการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก ครั้งที่ 2 ระหว่างวันที่ 28-29 พฤษภาคม 2552 ณ โรงแรม ดราคอน บีช รีสอร์ท พัทยา จังหวัดชลบุรี (โปสเตอร์)
- 38). จรรยา คงฤทธิ์ ณัทย์ วิจิตโรทัย และ **กานต์ สุขสุแพทย์** 2554. ผลการใช้กากกะทิในอาหารไก่เนื้อ. การประชุมสัมมนาทางวิชาการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก ครั้งที่ 4 ระหว่างวันที่ 26-27 พฤษภาคม 2554 ณ โรงแรม ชลจันทร์ รีสอร์ท พัทยา จังหวัดชลบุรี (โปสเตอร์)
- 39). **กานต์ สุขสุแพทย์** และ จรรยา คงฤทธิ์ .2554. การศึกษาผลของอาหารต่อคุณภาพเปลือกไข่เปิด : กรณีศึกษา-อำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม การประชุมสัมมนาทางวิชาการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก ครั้งที่ 4 ระหว่างวันที่ 26-27 พฤษภาคม 2554 ณ โรงแรม ชลจันทร์ รีสอร์ท พัทยา จังหวัดชลบุรี (โปสเตอร์)
- 40). **สุชีพ สุขสุแพทย์** และ พานิข แสนโกชน. 2524. ข้อมูลบางประการเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าพวงนกและไก่ฟ้า : การไข่และการฟักไข่. เอกสารประกอบการสัมมนาเรื่องสัตว์ป่าเมืองไทยครั้งที่ 2 คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 24-25 ธันวาคม 2524. หน้า 236-239.
- 41). **สุชีพ สุขสุแพทย์** และ พานิข แสนโกชน. 2524. เทคนิคในการฟักไข่ด้วยตู้ฟักไข่ไฟฟ้าและการดูแลลูกไก่ฟ้าระยะแรกเกิด. เอกสารประกอบการสัมมนาเรื่องสัตว์ป่าเมืองไทยครั้งที่ 2 คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 24-25 ธันวาคม 2524. หน้า 240-247.

### ผู้ร่วมวิจัย 3

1. ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นายจำรูญ เล้าสินวัฒนา, รศ.ดร.
2. ชื่อ-สกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Chamroon Laosinwattana, Associate Professor Dr.
3. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3-7502-00304-79-6
4. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้  
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ถนนฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520  
โทรศัพท์ 02-326-4318 โทรสาร 0-2326-4318  
E-mail klchamro@kmitl.ac.th
5. ประวัติการศึกษา
  - พ.ศ. 2535 วท.บ. (พืชไร่-นา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
  - พ.ศ. 2538 วท.ม. (พืชไร่-นา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
  - พ.ศ. 2542 Ph.D. (Plant Protection) Tokyo University of Agriculture and Technology, Japan
  - พ.ศ. 2544 Post Doctoral Weed Science (Allelopathy) Utsunomiya University, Japan
6. ประสบการณ์งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และ/หรือที่ผ่านมา ทั้งภายในและภายนอกประเทศ

### ทุนวิจัย

- 1 การแยกสารอัลลีโลพาที่จากพุทธรักษาถิ่นแดง (ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินปีพ.ศ. 2550) – หัวหน้าโครงการ (ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์)
- 2 การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากวัสดุธรรมชาติเพื่อการจัดการวัชพืชอย่างยั่งยืน (สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย พ.ศ. 2550-พ.ศ.2552) – หัวหน้าโครงการ (ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์)
- 3 การพัฒนาสารกำจัดวัชพืชจากชะอมเพื่อการจัดการวัชพืชอย่างยั่งยืน (งบประมาณแผ่นดินปี 2552) – หัวหน้าโครงการ (ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์)
- 4 ผลิตภัณฑ์กำจัดวัชพืชจากประยงค์(ทุนช่วยเหลือวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ครั้งที่ 15 พ.ศ. 2552 (มูลนิธิไทร) – หัวหน้าโครงการ (ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์)
- 5 การพัฒนารูปผลิตภัณฑ์และศึกษากลไกการทำลายวัชพืชของสารกำจัดวัชพืชจากชะอม (งบประมาณแผ่นดินปี 2553) – หัวหน้าโครงการ (ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์)
- 6 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติควบคุมวัชพืชจากพุทธรักษาถิ่นแดงเพื่อทดแทนสารเคมีสังเคราะห์ (สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยพ.ศ. 2552-2554) – หัวหน้าโครงการ
- 7 การพัฒนาสารชีวภาพจากผลกำจัดต้น(งบประมาณแผ่นดินปี 2547) – ผู้ร่วมวิจัย (ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์)
- 8 การศึกษาศักยภาพทางด้านอัลลีโลพาที่ของพุทธรักษาถิ่นแดง (งบประมาณแผ่นดินปี 2547) – ผู้ร่วมวิจัย (ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์)
- 9 การศึกษาศักยภาพของพืชในสกุล Aglaia เพื่อการจัดการวัชพืชแบบยั่งยืน (งบประมาณแผ่นดินปี 2547) – ผู้ร่วมวิจัย (ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์)
- 10 การศึกษาศักยภาพทางอัลลีโลพาที่ของ Walsura trichostemon Miq. (งบประมาณแผ่นดินปี 2548) – ผู้ร่วมวิจัย (ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์)

- 11 การสังเคราะห์ฮอร์โมนและอนุพันธ์เพื่อการควบคุมวัชพืช (งบประมาณแผ่นดินปี 2549) – ผู้ร่วมวิจัย (ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์)
- 12 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสเตียรอยด์สังเคราะห์(งบประมาณแผ่นดินปี 2549) – ผู้ร่วมวิจัย (ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์)
- 13 ผลของสารละลายเคมีบางชนิดที่มีต่อกายวิภาคของก้านช่อดอกและอายุการปักแจกันของช่อดอกประทุมมา (งบประมาณแผ่นดินปี 2550) – ผู้ร่วมวิจัย (ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์)
- 14 การศึกษาสารสกัดจากกานพลูและว่านกาบหอยเพื่อใช้ทดแทนสารเคมีคลุกเมล็ดในการเก็บรักษาเมล็ดถั่วเหลือง(งบประมาณแผ่นดินปี 2550) – ผู้ร่วมวิจัย (ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์)
- 15 การศึกษาสารสกัดจากกานพลูและว่านกาบหอยเพื่อใช้ทดแทนสารเคมีคลุกเมล็ดในการเก็บรักษาเมล็ดถั่วเหลือง (งบประมาณแผ่นดินปี 2550) – ผู้ร่วมวิจัย (ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์)
- 16 การพัฒนาเซนทอกซีลินเพื่อการควบคุมวัชพืช(งบประมาณแผ่นดินปี 2550) – ผู้ร่วมวิจัย (ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์)

#### ผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ

1. สืบศักดิ์ อนันต์พัฒนา, พัทณี เจริญยิ่ง และ จำรูญ เล้าสินวัฒนา. 2547. วิธีการทดสอบสารอัลลีโลพาที่จากผลกำจัดต้น. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 35 (5-6) ฉบับพิเศษ : 479-482.
2. วิรัตน์ ภูวิวัฒน์, จำรูญ เล้าสินวัฒนา และ ดารารัตน์ มณีจันทร์. 2547. ผลทางอัลลีโลพาที่ของสารสกัดที่แยกด้วยวิธี Solvent Partitioning จากใบพุทธรักษาที่กั้นแดงต่อการงอกและการเจริญเติบโตของต้นกล้าหญ้าข้าวนก. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 35 (5-6) ฉบับพิเศษ : 223-226.
3. วิรัตน์ ภูวิวัฒน์, จำรูญ เล้าสินวัฒนา, พัทณี เจริญยิ่ง และ ยี่งยง เมฆลอย. 2547. ผลของสารสกัดด้วยน้ำจากใบพืชในวงศ์ (Meliaceae) ต่อการงอกและการเจริญเติบโตของต้นกล้าหญ้าข้าวนก. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 35 (5-6) ฉบับพิเศษ : 467-470.
4. จำรูญ เล้าสินวัฒนา และวิรัตน์ ภูวิวัฒน์. 2547. ผลของสารสกัดด้วยน้ำจากใบหญ้าแฝกต่อการงอกของเมล็ดพืชทดสอบ. บทคัดย่อรายงานการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ 4 วันที่ 4-7 พฤษภาคม พ.ศ. 2547 โรงแรมเจบีหาดใหญ่ สงขลา. หน้า 181.
5. ศิริพร สายบุญตั้ง, จำรูญ เล้าสินวัฒนา และวิรัตน์ ภูวิวัฒน์. 2548. ผลของสารสกัดด้วยน้ำจากใบกระถินแห้งต่อการงอกและน้ำหนักแห้งของเมล็ดพืชทดสอบ. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 36 (5-6) ฉบับพิเศษ : 312-315.
6. วีระณีย์ ทองศรี, วิรัตน์ ภูวิวัฒน์ และจำรูญ เล้าสินวัฒนา. 2548. การควบคุมเชื้อรา Collectotrichum โดยใช้สารสกัดเมทานอลจากใบพุทธรักษาที่กั้นแดง. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 36 (5-6) ฉบับพิเศษ : 828-831.
7. วิรัตน์ ภูวิวัฒน์, พัทณี เจริญยิ่ง, จำรูญ เล้าสินวัฒนา และยี่งยง เมฆลอย. 2548. ศักยภาพทางอัลลีโลพาที่ของสารที่แยกได้จากสารสกัดใบประยงค์ในชั้นคลอโรฟอร์มชั้นที่ 8. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 36 (5-6) ฉบับพิเศษ : 974-977.
8. สุนีรัตน์ เรืองสมบูรณ์ และจำรูญ เล้าสินวัฒนา. 2548. ผลของสารสกัดจากสาหร่ายต่อการงอกของพืชทดสอบ. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 36 (5-6) ฉบับพิเศษ : 978-981.
9. โสภา ภูการ, พัทณี เจริญยิ่ง, จำรูญ เล้าสินวัฒนา, วิรัตน์ ภูวิวัฒน์ และนันทนา อรุณฤกษ์. 2548. ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากใบกาดลิ้น. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 36 (5-6) ฉบับพิเศษ : 998-1001.
10. วิรัตน์ ภูวิวัฒน์, จำรูญ เล้าสินวัฒนา และศุภชัย สถาพร. 2548. ผลของสารสกัดด้วยน้ำจากส่วนต่างๆ ของต้นสังเคียดใบเล็กต่อการงอกและการเจริญเติบโตของพืชทดสอบ 4 ชนิด. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 36 (5-6) ฉบับพิเศษ : 1002-1005.

11. จำรูญ เล้าสินวัฒนา, พัทนี เจริญยิ่ง, และวิรัตน์ ภูวิวัฒน์. 2548. การแยกสารอัลลีโลเคมีคอลจากหญ้าแฝก กลุ่มพันธุ์นครสวรรค์โดยวิธี solvent partitioning. บทความวิชาการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ 5 ณ โรงแรมเวลคัมจอมเทียนบีช พัทยา จ. ชลบุรี. หน้า 137
12. จำรูญ เล้าสินวัฒนา และวิรัตน์ ภูวิวัฒน์. 2548. ผลทางอัลลีโลพาตีของหญ้าแฝก (*Vetiveria* spp.) 10 กลุ่มพันธุ์. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 36 (5-6) ฉบับพิเศษ : 1006-1009.
13. วิรัตน์ ภูวิวัฒน์ จำรูญ เล้าสินวัฒนา พัทนี เจริญยิ่ง และยิ่งยง เมฆลอย. 2548. ผลการใช้ใบประยงค์ในการคลุมและคลุมผสมวัสดุปลูกต่อการงอกและการเจริญเติบโตของผักโขม. วารสารวิทยาศาสตร์การเกษตร 36 : (5-6) ฉบับพิเศษ : 1048-1051.
14. วณาวรรณ ปราบพยัคฆ์, ภัทรนันท์ โชติแสง, วิชญ รัชตเวชกุล, พัทนี เจริญยิ่ง และจำรูญ เล้าสินวัฒนา. 2548. ผลของสเตรอยด์ซัลเฟตต่อการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์ กข6. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 36 (5-6) ฉบับพิเศษ : 1095-1098.
15. สุธีรา ฉิมน้อย จำรูญ เล้าสินวัฒนา วิรัตน์ ภูวิวัฒน์ และพัชนี เจริญยิ่ง. 2551. ประสิทธิภาพของใบประยงค์ผงดต่อการเจริญเติบโตของพืชทดสอบ. บทความวิชาการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ 7 วันที่ 26-30 พฤษภาคม 2551 ณ โรงแรมอัมรินทร์ลากูล อ.เมือง จ.พิษณุโลก. หน้า 293.
16. วิรัตน์ ภูวิวัฒน์ จำรูญ เล้าสินวัฒนา และศุภชัย สถาพร. 2551. การเปรียบเทียบผลของสารสกัดจากพืชสกุล *Aglaia* 12 ชนิดต่อการงอก และการเจริญเติบโตของพืชทดสอบ. บทความวิชาการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 7 วันที่ 26-30 พฤษภาคม 2551 ณ โรงแรมอัมรินทร์ลากูล อ.เมือง จ.พิษณุโลก. หน้า 307.
17. พัทนี เจริญยิ่ง จำรูญ เล้าสินวัฒนา และวิรัตน์ ภูวิวัฒน์. 2551. การแยกสารอัลลีโลพาตีจากใบพุทธรักษา ก้านแดง. บทความวิชาการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ 7 วันที่ 26-30 พฤษภาคม 2551 ณ โรงแรมอัมรินทร์ลากูล อ.เมือง จ.พิษณุโลก. หน้า 320.
18. ธนัชสิทธิ์ พูนไพบูลย์พิพัฒน์ สุธีรา ฉิมน้อย จำรูญ เล้าสินวัฒนา วิรัตน์ ภูวิวัฒน์ และพัชนี เจริญยิ่ง. 2552. ประสิทธิภาพในการควบคุมวัชพืชของผลิตภัณฑ์จากใบประยงค์. การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ 8 เชียงใหม่ 6-9 พค. 52 หน้า 116.
19. วิรัตน์ ภูวิวัฒน์ จำรูญ เล้าสินวัฒนา หัตถ์ชัย กสิโอฬาร และศุภชัย สถาพร. 2552. ผลของสารสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์จากใบสังเคียดใบเล็กต่อการงอกและการเจริญเติบโตของพืชทดสอบ. การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 8 เชียงใหม่ 6-9 พค. 52 หน้า 202.

#### ผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

1. Laosinwattana C., Phuwiwat W. and Charoenying P.. 2007. Assessment of allelopathic potential of ten Vetivergrass (*Vetiveria* spp.) ecotypes. *Allelopathy Journal*. 19(2) : 469-478. (Impact factor = 0.686) ที่มา : Journal Citation Reports, 2007
2. Teerarak, M., Bhinija K., Thitavasanta S. and Laosinwattana C. 2008. The impact of sodium chloride on root growth, cell division, and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) in root tip cells of *Allium cepa* L. *Scientia Horticulturae*. (Impact factor = 0.694) ที่มา : Journal Citation
3. Laosinwattana, C., Poonpaiboonpipat T., Teerarak M., Phuwiwat W., Mongkolaussavaratana T. and Charoenying P. 2009. Pellet formulation of Chinese rice flower (*Aglaia odorata* Lour.) and its potential use as organic herbicide. *Allelopathy J.* 24(1) : 45-54. (Impact factor = 0.525) ที่มา : Journal Citation Reports, 2008

4. Charoenying, P., Chotsaeng P. and Laosinwattana C. 2010. Effects of *Spirulina platensis* and C-phycocyanin on seed germination and seedling growth of two monocot and dicot plants. *Allelopathy J.* 25(2) : 453-464. (Impact factor = 0.793) ที่มา : Journal Citation Reports, 2009
5. Charoenying, P., Teerarak, M. and Laosinwattana C. 2010. An allelopathic substance isolated from *Zanthoxylum limonella* Alston fruit. *Scientia Horticulturae.* 125 : 411-416. (Impact factor = 0.859) ที่มา : Journal Citation Reports, 2008
6. Teerarak, M., Laosinwattana C., Charoenying P. 2010. Evaluation of allelopathic, decomposition and cytogenetic activities of *Jasminum officinale* L.f. var. *grandiflorum* (L.) Kob. on bioassay plants. *Bioresource Technology.* 101 : 5677-5684. (Impact factor = 4.258) ที่มา : Journal Citation Reports, 2009
7. Chamroon Laosinwattana, Chaninat Boonleom, Montinee Teerarak, Sompop Thitavasanta and Patchanee Charoenying. 2010. Potential allelopathic effects of *Suregada multiflorum* and the influence of soil type on its residue's efficacy. *Weed Biology and Management.* 10 (3) : 153-159. (Impact factor = 0.743) ที่มา : Journal Citation Reports, 2009
8. Patchanee Charoenying, Chamroon Laosinwattana , Wirat Phuwiwat and Jarun Lomratsiri. 2008. Biological Activities of *Zanthoxylum Limonella* Alston Fruit Extracts. *KMITL SCIENCE JOURNAL* 8 (1): 12 -15 .

#### 7. การจดสิทธิบัตร

- 7.1 สิทธิบัตร เรื่อง “ผลิตภัณฑ์กำจัดวัชพืชชนิดเม็ดหรือผงจากประยงค์” เลขที่คำขอ 0801002574 วันรับคำขอ 23 พ.ค. 2551
- 7.2 สิทธิบัตร เรื่อง “กรรมวิธีการผลิตสารกำจัดวัชพืชจากพืชชาติก้านแดงและส่วนผสมที่ได้จากกรรมวิธีดังกล่าว” เลขที่คำขอ 0801005224 วันรับคำขอ 13 ต.ค. 2551

#### 8. รางวัลวิจัยที่เคยได้รับ

- 8.1 รางวัลยอดเยี่ยม Oral Presentation เรื่อง “ประสิทธิภาพของใบประยงค์ผงต่อการเจริญเติบโตของพืช” ในการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ 7 โดยนักศึกษาปริญญาโท
- 8.2 รางวัลชมเชย Poster Presentation เรื่อง “ผลทางอัลลีโลพาตีของสาหร่าย 10 ชนิด” ในการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ 7 โดยนักศึกษาปริญญาโท
- 8.3 ทุนช่วยเหลือวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ครั้งที่ 15 พ.ศ. 2552 (มูลนิธิโทเร) เรื่อง “ผลิตภัณฑ์กำจัดวัชพืชจากประยงค์”

### ผลผลิตจากการวิจัย

1. กัญญา จิระเจริญรัตน์ จุฑาทิพย์ เฉลิมวานิชวงศ์ ทิภาภรณ์ งามสง่า และ กนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์. 2557. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสโดยแบคทีเรียไอโซเลท ID2R1P1 จากกระเพาะหมักของกระบือ. วารสารสัตวศาสตร์แห่งประเทศไทย. 1(ฉบับพิเศษ 1): 253-256.
2. K. Jirajaroenrat, J. Chalermwanichwong, T. Ngamsanga, and K. Srikijkasemwat. 2015. Optimization of Culture Conditions of Bacteria Isolated from Buffalo Rumen for Cellulase and Xylanase Production. p. 345-348. In Proceedings the 2<sup>nd</sup> International Symposium on Agricultural Technology (ISAT2015). 1-3 July 2015. Pattaya, Thailand.