

การปรับปรุงพันธุ์ *Bacillus subtilis* ด้วยเทคนิคพลาสมาเย็น เพื่อผลิตอาหารสัตว์
หมักจากเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร



ธมลวรรณ ปั่นกอง

วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต และปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

พฤษภาคม 2568

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

การปรับปรุงพันธุ์ *Bacillus subtilis* ด้วยเทคนิคพลาสมาเย็น เพื่อผลิตอาหารสัตว์หมักจากเศษวัสดุ
เหลือใช้ทางการเกษตร



ฉัตรพร คุ้มทอง

วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต และปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
พฤษภาคม 2568
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

IMPROVEMENT OF *BACILLUS SUBTILIS* USING COLD PLASMA FOR FERMENTED FEED
PRODUCTION FROM AGRICULTURE WASTES



THAMONWAN PANKONG

A Thesis Submitted to University of Phayao
in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Bachelor of Science and Master of Science Degree in Environmental Science
May 2025
Copyright 2025 by University of Phayao

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การปรับปรุงพันธุ์ *Bacillus subtilis* ด้วยเทคนิคพลาสมาเย็น เพื่อผลิตอาหารสัตว์หมักจากเศษวัสดุ
เหลือใช้ทางการเกษตร

ของ รมลวรรณ ปั่นกอง

ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต และปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์

สิ่งแวดล้อม

ของมหาวิทยาลัยพะเยา

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ดร. สุรีย์พร สราภิรมย์)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(รองศาสตราจารย์ ดร. ชีรชัย อำนวยล้อเจริญ)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุชนูญา ทองเครือ)

..... คณบดีคณะพลังงานและสิ่งแวดล้อม

(รองศาสตราจารย์ ดร. ต่อพงศ์ กรีธาชาติ)

- เรื่อง:** การปรับปรุงพันธุ์ *Bacillus subtilis* ด้วยเทคนิคพลาสมาเย็น เพื่อผลิตอาหารสัตว์หมักจากเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร
- ผู้วิจัย:** ชมลวรรณ ปั่นทอง, วิทยานิพนธ์: วท.บ. (ชีววิทยา) และ วท.ม.(วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม), มหาวิทยาลัยพะเยา, 2567
- อาจารย์ที่ปรึกษา:** รองศาสตราจารย์ ดร. จีรัชย์ อำนวยลือเจริญ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุชัยญา ทองเครือ
- คำสำคัญ:** *Bacillus subtilis*, การกลายพันธุ์ครั้งที่ 2, เทคโนโลยีพลาสมาเย็น, เอนไซม์ไซลาลเนส, เศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร, อาหารสัตว์หมัก

บทคัดย่อ

แบคทีเรียมีบทบาทสำคัญในการกำจัดวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร โดยการปลดปล่อยเอนไซม์หลายชนิดในขณะการหมัก ซึ่งเอนไซม์ไซลาลเนสเป็นหนึ่งในเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการย่อย งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพิ่มประสิทธิภาพกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาลเนสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* พันธุ์กลาย (MT3.4) ที่ใช้ในการผลิตอาหารสัตว์หมักจากเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ครั้งที่ 2 ด้วยเทคโนโลยีพลาสมาเย็น โดยใช้ก๊าซอาร์กอนและฮีเลียมในการกำเนิดพลาสมา และระยะเวลาในการอาบพลาสมา 1-5 นาที พบแบคทีเรียจำนวน 581 ไอโซเลทเจริญบนอาหารแข็ง Luria-Bertani (LB) ภายหลังจากการอาบพลาสมา และพบว่าไอโซเลท MT2-428 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาลเนสสูงขึ้น 3.5 เท่าเมื่อเทียบกับ *B. subtilis* MT3.4 เมื่อนำแบคทีเรียพันธุ์กลาย MT2-428 มาตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเอด้วยเทคนิค High Annealing Temperature-Random Amplified Polymorphic DNA (HAT-RAPD) โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มจำนวน 5 ไพรเมอร์ พบว่าแบคทีเรียพันธุ์กลาย MT2-428 มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างจาก *B. subtilis* MT3.4 และจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาลเนสจากแบคทีเรียพันธุ์กลาย MT2-428 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาลเนส คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำแบคทีเรีย MT2-428 มาทดสอบการย่อยวัตถุดิบ 3 ชนิด ได้แก่ เปลือกทุเรียน, ชานอ้อย และเปลือกข้าวโพด เป็นเวลา 7 วันเปรียบเทียบกับชุดควบคุม, แบคทีเรียพันธุ์ดั้งเดิม และแบคทีเรียพันธุ์กลายครั้งที่ 1 *B. subtilis* MT3.4 ผลการทดสอบพบว่าแบคทีเรียพันธุ์กลาย MT2-428 มีความสามารถในการย่อยวัตถุดิบได้ดีกว่าการหมักเงื่อนไขอื่น ๆ โดยให้ค่าการปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด ดังนั้นแบคทีเรียพันธุ์กลาย MT2-428 เหมาะสมสำหรับการประยุกต์ใช้ผลิตอาหารสัตว์หมักจากเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

Title: IMPROVEMENT OF *BACILLUS SUBTILIS* USING COLD PLASMA FOR FERMENTED FEED PRODUCTION FROM AGRICULTURE WASTES

Author: Thamonwan Pankong, Thesis: B.Sc. (Biology) and M.Sc. (Environmental Science), University of Phayao, 2024

Advisor: Associate Professor Dr. Teerachai Amnuaylojaroen Co-advisor Assistant Professor Dr.Suchanya Thongkrua

Keywords: *Bacillus subtilis*, second mutation, cold plasma technology, xylanase, agriculture waste, fermented animal feed

ABSTRACT

Bacteria play a crucial role in the degradation of agricultural waste by secreting several enzymes during fermentation. Xylanase is one of the key enzymes involved in this process. Therefore, this research aimed to enhance the xylanase enzyme activity of a mutant *Bacillus subtilis* (MT3.4) which is used to produce fermented animal feed from agricultural waste. This was accomplished through a second mutation induction using cold plasma technology, employing argon and helium gases to produce the plasma and administering exposure lengths of 1-5 minutes. After plasma treatment, 581 bacterial isolates were found to grow on Luria-Bertani (LB) agar. Among these, isolate MT2-428 demonstrated a 3.5-fold enhancement in xylanase enzyme activity relative to the *B. subtilis* MT3.4. The genetic changes in the MT2-428 mutant strain were examined using the High Annealing Temperature-Random Amplified Polymorphic DNA (HAT-RAPD) technique with five random primers. The results revealed a distinct DNA fingerprint in MT2-428 compared to *B. subtilis* MT3.4. The optimal conditions for xylanase enzyme activity from the MT2-428 mutant strain were determined to be pH 6 and a temperature of 60 degrees Celsius. Subsequently, the MT2-428 mutant strain was then subjected to a 7-day degradation assay using three types of agricultural waste materials, including durian peel, sugarcane bagasse, and corn husk, in comparison with a control group, the wild type (*B. subtilis*), and the first mutant bacterial strain (*B. subtilis* MT3.4). The experimental results revealed that the MT2-428 mutant strain exhibited superior degradation capability compared to other fermentation conditions, yielding the highest reducing sugar release values. Thus, the MT2-428 mutant strain is suitable for application in the production of fermented animal feed from agricultural waste materials.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความกรุณาจากรองศาสตราจารย์ ดร.ธีรชัย อำนวย ล้อเจริญ อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชัยญา ทองเครือ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุกัญญา สืบแสน และดร.กันตา แสงวิจิตร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและคำปรึกษาจน วิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอขอบพระคุณ ดร.สุรีย์พร สราภิรมย์ อาจารย์จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ได้กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งให้ คำแนะนำเพิ่มเติมที่เป็นประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และอาจารย์ สาขาวิชาวิทยา ศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะพลังงานและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยพะเยาที่อบรมสั่งสอนประสิทธิ์ประสาท วิชาความรู้และประสบการณ์ต่าง ๆ ให้แก่ผู้วิจัยจนสำเร็จการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่ได้มอบทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์ ประจำปี 2566 ฉบับที่ 2 เพื่อเป็นทุนสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านชีววิศวกรรม พลาสมา มหาวิทยาลัยพะเยา ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และเครื่องมือในการทำวิจัย ขอขอบคุณ เกษตรกรบ้านไ้ หมู่ 2 ตำบลแม่ณาเรื่อ อำเภอเมืองพะเยา จังหวัดพะเยา ร้านขายน้ำอ้อยสดย่าดา แยก เกษตรสุข ถนนพหลโยธิน อำเภอเมืองพะเยา จังหวัดพะเยา ร้านขายน้ำอ้อยสดพะเยา Hometown ถนนพหลโยธิน เวียง อำเภอเมืองพะเยา ร้านทุเรียนนายดำ ถนนเมืองชุม ตำบลแม่ต๋ำ อำเภอเมืองพะเยา จังหวัดพะเยา ที่ให้ความอนุเคราะห์วัตถุดิบสำหรับทดสอบการผลิตอาหารสัตว์หมัก

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดามารดา ญาติพี่น้อง และเพื่อน ๆ ที่คอยเป็นกำลังใจและให้ คำปรึกษา ข้อเสนอแนะในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ ประโยชน์ที่ได้จากงานวิทยานิพนธ์ขอบอบแต่ อาจารย์ ผู้ที่สนใจในการศึกษา หากผิดพลาดประการใดขอน้อมรับไว้ด้วยความขอบคุณยิ่ง

ธมลวรรณ ปั่นกอง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่จะได้รับการวิจัย.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร	4
การจัดการเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร	4
การผลิตอาหารสัตว์หมัก.....	7
เอนไซม์ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต.....	13
เอนไซม์ไซลานเนส (xylanase)	13
เศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร	14
เปลือกทุเรียน	14
ขานอ้อย.....	15
เปลือกข้าวโพด.....	16

พลาสมา (Plasma).....	17
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	19
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	21
อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมี	21
อุปกรณ์	21
เครื่องมือ	22
สารเคมี	23
วิธีดำเนินงานวิจัย	25
การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ครั้งที่ 2 ของแบคทีเรียพันธุ์กลาย <i>B. subtilis</i> MT3.4 ด้วยเทคนิคพลาสมาเย็น	25
การคัดเลือก <i>B. subtilis</i> พันธุ์กลาย ที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ครั้งที่ 2.....	26
การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซลานเนสและโครงสร้างโปรตีนของเอนไซม์ ไซลานเนสจากแบคทีเรียพันธุ์กลายครั้งที่ 2	27
การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียพันธุ์ <i>B. subtilis</i> MT2-428.....	32
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนส	33
การผลิตอาหารสัตว์หมักจากเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยแบคทีเรียพันธุ์กลาย ที่ถูกคัดเลือกในระดับห้องปฏิบัติการ.....	34
การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	36
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล/ผลการทดลอง	37
อัตราการรอดชีวิตและการคัดเลือกแบคทีเรียพันธุ์กลายที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ครั้งที่ 2. 37	
ผลของการวิเคราะห์ความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอด้วยเทคนิค HAT-RAPD.....	38
ผลของความแตกต่างที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสจาก <i>B. subtilis</i> MT2-428	
เปรียบเทียบกับ <i>B. subtilis</i> MT3.4	41
ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสจาก <i>B. subtilis</i> MT2-428 เปรียบเทียบกับ <i>B. subtilis</i> MT3.4.....	42

ผลการทดสอบการย่อยวัตถุดิบแต่ละชนิดด้วยแบคทีเรีย	45
ผลการผลิตอาหารสัตว์หมักจากเปลือกทุเรียน ชานอ้อย และเปลือกข้าวโพดด้วยแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> MT2-428.....	49
ผลการตรวจสอบลักษณะของอาหารสัตว์หมักภายใต้กล้องจุลทรรศน์	51
บทที่ 5 บทสรุป.....	56
สรุปผลการวิจัย.....	56
อภิปรายผลการวิจัย	56
บรรณานุกรม.....	60
ภาคผนวก.....	70
ภาคผนวก ก. อาหารเลี้ยงเชื้อ	71
ภาคผนวก ข. การเตรียมสาร.....	71
ภาคผนวก ค. การทำกราฟมาตรฐานของสารละลายไซโลสและโปรตีน.....	72
ภาคผนวก ง. การคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) และค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (specific activity).....	74
ภาคผนวก จ. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (crude protein) (AOAC, 2000)	75
ภาคผนวก ฉ. การวิเคราะห์หา Neutral Detergent Fiber (NDF) (Van Soest, 1991).....	77
ภาคผนวก ช. การวิเคราะห์หาลิกนิน (lignin) (Van Soest, 1991).....	78
ภาคผนวก ซ อาหารสัตว์หมักสำหรับ 60 วันโดยมีเปลือกทุเรียน ชานอ้อย และเปลือกข้าวโพดเป็นวัตถุดิบ	78
ประวัติผู้วิจัย.....	81

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 วิธีการกำจัดเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร.....	4
ตาราง 2 ไพรเมอร์แบบสุ่มและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์	28
ตาราง 3 ส่วนผสมสำหรับพีซีอาร์เพิ่มปริมาณยีนไซลาเนส.....	29
ตาราง 4 ส่วนผสมของขั้นตอนการตัดเอนไซม์.....	31
ตาราง 5 ส่วนผสมการเชื่อมพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) ด้วยวิธี T4 ligation	31
ตาราง 6 ส่วนผสมในการทำอาหารสัตว์หมัก.....	35
ตาราง 7 แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสเทียบกับแบคทีเรียชุดควบคุม (<i>B. subtilis</i> MT3.4)	38
ตาราง 8 โภชนะอาหารสัตว์หมักจาก เปลือกทุเรียน ชานอ้อย และเปลือกข้าวโพด เป็นเวลา 60 วัน.....	50
ตาราง 9 ตัวอย่างอาหารสัตว์หมักเปรียบเทียบที่ 0 วันและ 60 วัน โดยมี เปลือกทุเรียน ชานอ้อย และเปลือกข้าวโพดเป็นวัตถุดิบ.....	79



สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพ 1 กระบวนการย่อยอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง.....	9
ภาพ 2 องค์ประกอบของผนังเซลล์วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร	10
ภาพ 3 โครงสร้างของเซลลูโลส	11
ภาพ 4 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส	11
ภาพ 5 โครงสร้างทางเคมีของลิกนิน	12
ภาพ 6 โครงสร้างของไซแลนและกลไกการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายไซแลน โดย (a) โครงสร้างของไซแลนและตำแหน่งที่ถูกโจมตีโดยเอนไซม์ย่อยสลายไซแลน และ (b) การย่อยสลายไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยเบต้าไซโลซิเดส	14
ภาพ 7 โครงสร้างพื้นฐานวิทยาของทุเรียน.....	15
ภาพ 8 ชานอ้อย.....	16
ภาพ 9 เปลือกข้าวโพด.....	17
ภาพ 10 พลาสมาเย็น.....	25
ภาพ 11 อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียพันธุ์กลายที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ครั้งที่ 2 ด้วยเทคโนโลยีพลาสมาเย็นโดยใช้อาร์กอนและฮีเลียมพลาสมา ที่ระยะเวลา 1, 2, 3 และ 5 นาที.....	37
ภาพ 12 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 4 ไพรเมอร์ได้แก่ OPC06, OPH15, OPAT13 และ OPAZ12: เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน lambda/PstI, เลน 1 และ 2 คือ <i>B. subtilis</i> MT3.4, เลน 3 และ 4 คือ <i>B. subtilis</i> MT2-428	39
ภาพ 13 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนระหว่าง <i>B. subtilis</i> พันธุ์ดั้งเดิม (CxynA), <i>B. subtilis</i> MT3.4 (MxynA) และ <i>B. subtilis</i> MT2-428 โดยตำแหน่งกรดอะมิโนไฮโดรไลซิสเชิงลบคือตำแหน่งที่มีการแทนที่ของกรดอะมิโนจาก Leu เป็น Pro และตำแหน่งกรดอะมิโนที่ไฮโดรไลซิสเชิงลบคือตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนกลับของกรดอะมิโนจาก Ser เป็น Thr กรอบเส้นประสีแดงคือบริเวณเร่ง (active site) 40	
ภาพ 14 โครงสร้างโปรตีน 3 มิติของยีนไซลานเนส โดยภาพ A คือโครงสร้างโปรตีนของยีน ไซลานเนสแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> พันธุ์ดั้งเดิม ภาพ B คือโครงสร้างโปรตีนของยีนไซลานเนสแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i>	

MT3.4 และภาพ C คือโครงสร้างโปรตีน 3 มิติของยีนไฮลาเนสแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> MT2-428	
ตำแหน่งที่ถูกครีเสดจ์คือตำแหน่งที่มีการแทนที่ของกรดอะมิโนจาก ลิวซีน (Leu) เป็นโพรลีน (Pro) และตำแหน่งที่ถูกครีเสดจ์คือตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีการเปลี่ยนกลับจากเซอรีน (Ser) เป็นทรีโอนีน (Thr).....	41
ภาพ 15 กิจกรรมเอนไซม์ไฮลาเนสในสภาวะความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ 3.0–10.0 ของ <i>B. subtilis</i> MT3.4 (กรอบลายจุด) และ <i>B. subtilis</i> MT2-428 (กรอบลายเส้นทแยง) ที่ระดับความเข้มข้น 95	42
ภาพ 16 กิจกรรมเอนไซม์ไฮลาเนสในสภาวะอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ 30–100 องศาเซลเซียส ของ <i>B. subtilis</i> MT3.4 (กรอบลายจุด) และ <i>B. subtilis</i> MT2-428 (กรอบลายเส้นทแยง) ที่ระดับความเข้มข้น 95	43
ภาพ 17 ความเสถียรของเอนไซม์ไฮลาเนสของ <i>B. subtilis</i> MT3.4 และ <i>B. subtilis</i> MT2-428 ภายใต้สภาวะความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกันตั้งแต่ 3–10 ที่ระดับความเข้มข้น 95.....	44
ภาพ 18 ความเสถียรของเอนไซม์ไฮลาเนสของ <i>B. subtilis</i> MT3.4 และ <i>B. subtilis</i> MT2-428 ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกันตั้งแต่ 30–100 องศาเซลเซียส ที่ระดับความเข้มข้น 95.....	44
ภาพ 19 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกปลดปล่อยจากการทดสอบการย่อยเปลือกทุเรียน โดยกรอบลายข้าวหลามตัด คือ เปลือกทุเรียนที่หมักด้วยน้ำเปล่า, กรอบสี่เหลี่ยม คือ เปลือกทุเรียนที่หมักด้วยแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> พันธุ์ดั้งเดิม, กรอบลายจุด คือ เปลือกทุเรียนที่หมักด้วยแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> MT3.4 และ กรอบลายเส้นแนวทแยง คือ เปลือกทุเรียนที่หมักด้วยแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> MT2-428	45
ภาพ 20 กราฟแสดงการย่อยวัตถุดิบของแบคทีเรียในชานอ้อย โดย กรอบลายข้าวหลามตัด คือ ชานอ้อยที่หมักด้วยน้ำเปล่า, กรอบสี่เหลี่ยม คือ ชานอ้อยที่หมักด้วยแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> พันธุ์ดั้งเดิม, กรอบลายจุด คือ ชานอ้อยที่หมักด้วยแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> MT3.4 และ กรอบลายเส้นแนวทแยง คือ ชานอ้อยที่หมักด้วยแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> MT2-428.....	46
ภาพ 21 กราฟแสดงการย่อยวัตถุดิบของแบคทีเรียในเปลือกข้าวโพด โดยกรอบลายข้าวหลามตัด คือ เปลือกข้าวโพดที่หมักด้วยน้ำเปล่า, กรอบสี่เหลี่ยม คือ เปลือกข้าวโพดที่หมักด้วยแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> พันธุ์ดั้งเดิม, กรอบลายจุด คือ เปลือกข้าวโพดที่หมักด้วยแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> MT3.4 และ กรอบลายเส้นแนวทแยง คือ เปลือกข้าวโพดที่หมักด้วยแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> MT2-428	46

ภาพ 22 กราฟแสดงการเจริญของแบคทีเรียในชุดการทดสอบย่อยเปลือกทุเรียน โดยกรอบลายข้าว
หลามตัด คือ เปลือกทุเรียนที่หมักด้วยน้ำเปล่า, กรอบสีเทา คือ เปลือกทุเรียนที่หมักด้วยแบคทีเรีย B. subtilis พันธุ์ดั้งเดิม, กรอบลายจุด คือ เปลือกทุเรียนที่หมักด้วยแบคทีเรีย B. subtilis MT3.4 และ
กรอบลายเส้นแนวทแยง คือ เปลือกทุเรียนที่หมักด้วยแบคทีเรีย B. subtilis MT2-428 47

ภาพ 23 กราฟแสดงการเจริญของแบคทีเรียในชุดการทดสอบย่อยขานอ้อย โดยกรอบลายข้าวหลาม
ตัด คือ ขานอ้อยที่หมักด้วยน้ำเปล่า, กรอบสีเทา คือ ขานอ้อยที่หมักด้วยแบคทีเรีย B. subtilis พันธุ์
ดั้งเดิม, กรอบลายจุด คือ ขานอ้อยที่หมักด้วยแบคทีเรีย B. subtilis MT3.4 และ กรอบลายเส้นแนว
ทแยง คือ ขานอ้อยที่หมักด้วยแบคทีเรีย B. subtilis MT2-428 48

ภาพ 24 กราฟแสดงการเจริญของแบคทีเรียในชุดการทดสอบย่อยเปลือกข้าวโพด โดยกรอบลายข้าว
หลามตัด คือ เปลือกข้าวโพดที่หมักด้วยน้ำเปล่า, กรอบสีเทา คือ เปลือกข้าวโพดที่หมักด้วยแบคทีเรีย
B. subtilis พันธุ์ดั้งเดิม, กรอบลายจุด คือ เปลือกข้าวโพดที่หมักด้วยแบคทีเรีย B. subtilis MT3.4
และ กรอบลายเส้นแนวทแยง คือ เปลือกข้าวโพดที่หมักด้วยแบคทีเรีย B. subtilis MT2-428..... 48

ภาพ 25 ภาพเปรียบเทียบชิ้นส่วนตัวอย่างอาหารสัตว์หมักจากเปลือกทุเรียนเป็นเวลา 60 วัน
ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope) ที่กำลังขยาย 8 เท่าและ 40 เท่า .. 52

ภาพ 26 ภาพเปรียบเทียบชิ้นส่วนตัวอย่างอาหารสัตว์หมักจากขานอ้อยเป็นเวลา 60 วัน ตรวจสอบ
ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope) ที่กำลังขยาย 8 เท่าและ 40 เท่า 52

ภาพ 27 ภาพเปรียบเทียบชิ้นส่วนตัวอย่างอาหารสัตว์หมักจากเปลือกข้าวโพดเป็นเวลา 60 วัน
ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope) ที่กำลังขยาย 8 เท่าและ 40 เท่า .. 53

ภาพ 28 ภาพตัวอย่างอาหารสัตว์หมักเป็นเวลา 60 วันโดยมีเปลือกทุเรียนเป็นวัตถุดิบ โดย A คือ
เปลือกทุเรียนที่ไม่ผ่านการหมัก B คือเปลือกทุเรียนหมักโดยไม่เติมเชื้อกลุ่มผลิตไซลานเนส (ชุด
ควบคุม) C คือเปลือกทุเรียนที่เติมเชื้อแบคทีเรีย B. subtilis MT3.4 และ D คือเปลือกทุเรียนที่เติม
เชื้อแบคทีเรีย B. subtilis MT2-428 53

ภาพ 29 ภาพตัวอย่างอาหารสัตว์หมักเป็นเวลา 60 วันโดยมีขานอ้อยเป็นวัตถุดิบ โดย A คือขานอ้อย
ที่ไม่ผ่านการหมัก B คือขานอ้อยหมักโดยไม่เติมเชื้อแบคทีเรียกลุ่มผลิตไซลานเนส (ชุดควบคุม) C คือ
ขานอ้อยที่เติมเชื้อแบคทีเรีย B. subtilis MT3.4 และ D คือขานอ้อยที่เติมแบคทีเรีย B. subtilis
MT2-428 54

ภาพ 30 ภาพตัวอย่างอาหารสัตว์หมักเป็นเวลา 60 วันโดยมีเปลือกข้าวโพดเป็นวัตถุดิบ โดย A คือ
เปลือกข้าวโพดที่ไม่ผ่านการหมัก B คือเปลือกข้าวโพดหมักโดยไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียผลิต ไซลานเนส (ชุด

ควบคุม) C คือเปลือกข้าวโพดที่เติมเชื้อแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> MT3.4 และ D คือเปลือกข้าวโพดที่เติมเชื้อแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> MT2-428.....	55
ภาพ 31 กราฟมาตรฐานไซโลส.....	73
ภาพ 32 กราฟมาตรฐานโปรตีน.....	74



บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม สถิติในปีพ.ศ. 2562 ประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกทางการเกษตร 149,252,451 ไร่ (กระทรวงดิจิทัลเพื่อเศรษฐกิจและสังคม, 2562) ซึ่งพืชเศรษฐกิจของไทยมีหลายชนิด เช่น ข้าว มันสำปะหลัง ปาล์มน้ำมัน ยางพารา อ้อย ลำไย มะม่วงทุเรียน เป็นต้น (สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, 2564) ในแต่ละปีจึงมีผลผลิตทางการเกษตรจำนวนมาก และส่งผลให้เกิดวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรจำนวนมากด้วยเช่นกัน โดยพบว่าในปีพ.ศ. 2566-2567 มีเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่เกิดขึ้นจากภาคเกษตรประมาณ 44.49 ล้านตัน (อิศย์อาณิกม ชิตวิเศษ และชลธิชา จันแปงเงิน, 2567) และโดยส่วนใหญ่เศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจะถูกกำจัดด้วยการเผาซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายต่อการจัดการของเกษตรกร แต่ส่งผลให้เกิดมลพิษทางอากาศ และเป็นการทำลายสิ่งแวดล้อม เกิดฝุ่นควันกระจายทั่วบริเวณใกล้เคียง รวมถึงเกิดฝุ่นละอองขนาดเล็กไม่เกิน 2.5 ไมครอน (particulate matter with diameter of less than 2.5 micron : PM 2.5) ซึ่งคิดเป็นสัดส่วนร้อยละ 5 ของปริมาณ PM 2.5 ทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากแหล่งกำเนิดอื่น ๆ (กรมควบคุมมลพิษ, 2561) นอกจากนี้การเผาในพื้นที่การเกษตรยังเป็นการทำลายโครงสร้างและความอุดมสมบูรณ์ของดินทำให้ดินเสื่อมโทรมขาดความอุดมสมบูรณ์ และผลผลิตที่ได้รับต่ำกว่าที่ควรจะเป็น จึงมีการส่งเสริมให้นำเศษวัสดุการเกษตรมาใช้ให้เกิดประโยชน์ หรือเพิ่มมูลค่า ทดแทนการเผา (กองวิจัยและพัฒนาส่งเสริมการเกษตร, 2563) ทั้งนี้การจัดการเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรอย่างรวดเร็วและไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม และช่วยลดต้นทุนให้กับเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ คือ การนำเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาผลิตอาหารสัตว์หมัก โดยส่งเสริมให้เกษตรกรใช้วัตถุดิบที่มีในท้องถิ่น จากการเข้าหารือกับวิสาหกิจชุมชนเพียวพลัสฟาร์ม จังหวัดนครสวรรค์ ซึ่งเป็นองค์กรที่มีการนำเอาเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาผลิตอาหารสัตว์หมักโดยใช้เปลือกทุเรียนเป็นวัตถุดิบแต่ทางวิสาหกิจชุมชนพบปัญหาการผลิตที่ไม่เพียงพอต่อความต้องการของสมาชิกและวิสาหกิจชุมชนต้องการที่จะผลิตอาหารสัตว์หมักครอบคลุมตลอดทั้งปีโดยการใช้เศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีในพื้นที่จังหวัดนครสวรรค์หรือพื้นที่ใกล้เคียง ผลจากการหาแนวทางแก้ไขปัญหาร่วมกันได้มีแนวคิดในการนำกากขี้เถ้าซึ่งมีการเพาะปลูกในพื้นที่จังหวัดกำแพงเพชรมาพัฒนาเป็นอาหารสัตว์หมัก เพื่อเป็นการลดปริมาณเศษ

วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรในพื้นที่และส่งผลให้เกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์มีอาหารสัตว์หมักต้นทุนต่ำ ทดแทนอาหารสัตว์สำเร็จรูปราคาสูงที่จำหน่ายในท้องตลาดตลอดทั้งปี อีกทั้งเป็นการลดการเผาในพื้นที่จังหวัดกำแพงเพชร

กระบวนการหมักอาหารสัตว์เป็นการนำเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาหมักร่วมกับ จุลินทรีย์เพื่อให้เกิดการย่อยวัตถุดิบให้มีความอ่อนนุ่มลง และให้ได้สารอาหาร พลังงาน และเยื่อใย ตามความต้องการของสัตว์ ในกระบวนการหมักจึงจำเป็นต้องใช้เอนไซม์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นมาช่วยย่อย โครงสร้างของพืช โดยโครงสร้างของวัสดุทางการเกษตรส่วนมากประกอบของเซลลูโลสร้อยละ 45-55 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 25-35 และลิกนิน (Polşa et al, 2019) ดังนั้นเอนไซม์ที่เป็นกลุ่มเอนไซม์หลักใน กระบวนการหมักจึงเป็นเอนไซม์กลุ่มย่อยคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ เซลลูเลส (cellulase) ไซลานเนส (xylanase) อะไมเลส (amylase) จึงมีการศึกษาและคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เหล่านี้้อย่าง กว้างขวางโดยเฉพาะเอนไซม์กลุ่มเซลลูเลส ทั้งนี้งานวิจัยของ Polşa et al. (2019) พบว่าการผลิต อาหารสัตว์หมักจากเปลือกทุเรียนโดยใช้ *Bacillus subtilis* พันธุ์กลาย (*Bacillus subtilis* MT3.4) ที่มีประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไซลานเนสสูงขึ้น จะได้อาหารสัตว์หมักต้นทุนต่ำที่มีโภชนาที่ เหมาะสมต่อการเลี้ยงโคนม แต่จากการวิเคราะห์บริเวณที่เกิดการกลายพันธุ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีนไซลานเนสพบว่า บริเวณที่เกิดการกลายพันธุ์นั้นอยู่นอกเหนือจากบริเวณเร่ง (active site) ของ เอนไซม์ ดังนั้นแบคทีเรียพันธุ์นี้จึงมีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาศักยภาพเพิ่มเติมได้อีกจากการชักนำให้ เกิดการกลายพันธุ์ ณ บริเวณที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

งานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายในการจัดการวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรในพื้นที่ที่เป็นความต้องการ ของผู้ประกอบการ โดยการเพิ่มประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่ใช้ผลิตอาหารสัตว์หมักด้วยวัตถุดิบที่ ต่างกัน โดยชักนำแบคทีเรีย *B. subtilis* MT3.4 ให้เกิดการกลายพันธุ์ครั้งที่ 2 ด้วยพลาสมาเย็น ซึ่ง สามารถใช้เป็นแนวทางในการจัดการเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่แตกต่างกันตามพื้นที่มาผลิต อาหารสัตว์หมักต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไซลานเนสจาก *B. subtilis* MT3.4 โดย ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ครั้งที่ 2 ด้วยเทคโนโลยีพลาสมาเย็น และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงาน ของเอนไซม์ไซลานเนส

เพื่อผลิตอาหารสัตว์หมักโดยใช้เศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรได้แก่ เปลือกทุเรียน ชานอ้อย และเปลือกข้าวโพด โดยอาศัยแบคทีเรียพันธุ์กลายที่ถูกคัดเลือก

ขอบเขตของการวิจัย

ขอบเขตด้านเนื้อหา

นำแบคทีเรียพันธุ์กลาย *B. subtilis* MT3.4 จากงานวิจัยของ Polsa et al. (2019) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคพลาสมาเย็น และพบว่ามีประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซลานสูงกว่ชุดควบคุม มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ครั้งที่ 2 โดยใช้เทคโนโลยีพลาสมาเย็น ใช้ก๊าซฮีเลียมและอาร์กอนในการผลิตพลาสมาที่ระยะเวลา 1, 2, 3 และ 5 นาที จากนั้นตรวจสอบการกลายพันธุ์โดยการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์ไคลาเนสจากแบคทีเรีย *B. subtilis* s MT3.4 และแบคทีเรียที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ครั้งที่ 2 และคัดเลือกแบคทีเรียพันธุ์กลายที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไคลาเนสที่แตกต่างจากชุดควบคุมมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไคลาเนสที่เปลี่ยนไป และเปรียบเทียบโครงสร้างโปรตีนไคลาเนสจากแบคทีเรียพันธุ์กลายครั้งที่ 2 และ *B. subtilis* MT3.4 (ชุดควบคุม) รวมถึงหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไคลาเนสและผลิตอาหารสัตว์หมักในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้เปลือกทุเรียน ชานอ้อย และเปลือกข้าวโพดเป็นวัตถุดิบในถังหมักขนาด 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 60 วัน

ขอบเขตของเวลา

มกราคม พ.ศ. 2565 – ตุลาคม พ.ศ. 2567

ประโยชน์ที่จะได้รับการวิจัย

ได้แนวทางในการจัดการเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรโดยการนำเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรในพื้นที่กลับมาใช้ให้เกิดประโยชน์ ซึ่งเป็นการจัดการขยะจากภาคการเกษตรที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร หมายถึง สิ่งที่เหลือจากผลผลิตทางการเกษตร หรือสิ่งที่ทิ้งค้างจากการเก็บเกี่ยวผลผลิตทางการเกษตร หรือซากทางการเกษตร (ตุลญา โรจน์ทั้งคำ, 2563) ยกตัวอย่าง เช่น ชังและต้นข้าวโพด ชานอ้อย ฟางข้าว เหง้ามันสำปะหลัง เปลือกทุเรียน เป็นต้น จากการสืบค้นพบว่าในปี พ.ศ. 2566 - 2567 มีเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรรวมประมาณ 44.49 ล้านตัน (อิชย์อาณิคม ชิตวิเศษ และชลธิชา จันแบ่งเงิน, 2567) ซึ่งส่งผลให้เกิดปัญหาทางสิ่งแวดล้อมตามมาจากการกำจัดเศษวัสดุเหล่านี้ด้วยวิธีการที่ไม่เหมาะสม

การจัดการเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

ภายหลังฤดูกาลเก็บเกี่ยวในแต่ละปี จะมีเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรจำนวนมาก และเกษตรกรจำเป็นต้องกำจัดเศษวัสดุเหลือใช้เหล่านี้เพื่อเตรียมการเพาะปลูกในฤดูถัดไป หรือเพื่อจัดการขยะออกจากพื้นที่ ดังนั้นจึงมีแนวทางในการกำจัดเศษวัสดุเหลือใช้เหล่านี้หลากหลายวิธี แต่ละวิธีมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน ดังตารางที่ 1

ตาราง 1 วิธีการกำจัดเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

วิธีการ	ข้อดี	ข้อเสีย	อ้างอิง
1. การฝังกลบ คือ การขุดหลุมและฝังกลบแบบที่ราบ โดยรวบรวมชีวมวลแล้วใช้เครื่องจักรกลบอัดให้แน่น และใช้ดินกลบทับอีกชั้นหนึ่ง เพื่อป้องกันการเกิดปัญหาในด้านกลิ่นและแมลง	เป็นแหล่งสารอาหารที่อุดมสมบูรณ์ให้แก่ดิน ต้นไม้ หรือพืชผลทางการเกษตร	ต้องใช้พื้นที่ขนาดใหญ่ในการฝังกลบ และมีระยะเวลาในการย่อยสลายในธรรมชาตินานหรือทำ อาจเกิดน้ำเสีย และแก๊สมีเทนปนเปื้อนระหว่างชั้นสู่ดิน แม่น้ำและอากาศ	กรมควบคุมมลพิษ, 2556

ตาราง 1 (ต่อ)

วิธีการ	ข้อดี	ข้อเสีย	อ้างอิง
2. การเผา คือ การกำจัดเศษวัสดุเหลือใช้ทางเกษตรด้วยการจุดไฟเผาในที่โล่งแจ้ง	มีความสะดวกและรวดเร็ว ประหยัดเวลา และค่าใช้จ่าย	ทำให้เกิดมลพิษทางอากาศ ซึ่งเป็นผลเสียต่อสิ่งมีชีวิตโดยรอบ ทำให้แร่ธาตุในดินบางชนิดหายไปจากความร้อนและยังทำลายหน้าดินซึ่งเกษตรกรส่วนใหญ่มีความเข้าใจว่าการเผาทำให้สามารถควบคุมปริมาณของศัตรูพืชได้และสามารถไถพรวนดินได้ง่าย	วิลารรณ น้อยภา และวาสิฐี ภักดีสุน , 2564
3. การไถกลบตอซังข้าวหรือเศษพืชทางเกษตรต่าง ๆ คือ การใช้เครื่องจักรหรือรถไถไถพรวนดิน	เพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดิน ช่วยปรับปรุงโครงสร้างของดิน	ในการไถกลบมีค่าใช้จ่ายในการจ้างรถไถกลบ และต้องรอให้ตอซังข้าวหรือเศษซากพืชให้เน่าหรือย่อยสลายก่อนไถกลบ ซึ่งระยะเวลาในการทำนาหรือการปลูกพืชผลทางการเกษตรจะปลูกกันอย่างน้อยปีละ 2-3 ครั้ง ดังนั้นจึงต้องใช้ความรีบเร่งในการเตรียมดินทำให้เกิดปัญหาคือรถไถนาไม่สามารถไถกลบตอซังข้าวได้ง่าย	สุธีระ บุญญาพิทักษ์, 2564; มลิวลย์ บุญหล้า, 2554

ตาราง 1 (ต่อ)

วิธีการ	ข้อดี	ข้อเสีย	อ้างอิง
4. การทำปุ๋ยหมัก คือ การหมักเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรกับน้ำสัมนวันไม้หรือมูลสัตว์เพื่อให้ย่อยสลายกลายเป็นปุ๋ยให้แก่พืชหรือต้นไม้ได้	ลดต้นทุนการซื้อปุ๋ยเคมีสามารถทำได้เอง	สารอาหารในการทำปุ๋ยหมักไม่เพียงพอต่อพืชผลเท่าที่ควร	สุนน โพธิ์จันทร์, 2552
5. การนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องใช้ในชีวิตรประจำวัน โดยการนำเอาเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ชานอ้อย ชังข้าวโพด เป็นต้น มาแปรรูปให้เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในชีวิตประจำวัน	สามารถลดขยะจำพวกกระดาษและพลาสติกเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม มีความทนทานและสามารถย่อยสลายโดยการฝังกลบซึ่งใช้ระยะเวลาโดยประมาณ 45 วัน	ผลิตภัณฑ์หรือสินค้าที่มาจากการแปรรูปจากเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมีราคาแพงเนื่องจากต้นทุนการผลิตสินค้าหรือผลิตภัณฑ์นั้นๆ	อุทัย, 2551 [สื่อออนไลน์]
6. การนำไปเป็นเชื้อเพลิงหรือการแปรรูปเพื่อเป็นเชื้อเพลิง โดยการทำเป็นรูปแบบอัดแท่งที่เกิดจากการเผาเพื่อให้กลายเป็นถ่านหรือถ่านดำและนำมาแปรรูปเพื่อเป็นเชื้อเพลิง	สามารถลดต้นทุนการซื้อถ่านหรือวัสดุในการทำเป็นเชื้อเพลิงเพื่อการดำรงชีวิต สามารถลดปริมาณเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรในการฝังกลบได้	ในกระบวนการการผลิตนั้นมีการเผาซึ่งเป็นหนึ่งในสาเหตุในการเกิดมลพิษทางอากาศ เศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรบางอย่างหากถูกเผาไหม้เพื่อแปรรูปเป็นเชื้อเพลิงเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์หรือควันในการผลิตได้	expresso, 2021 [สื่อออนไลน์]

ตาราง 1 (ต่อ)

วิธีการ	ข้อดี	ข้อเสีย	อ้างอิง
7. การทำอาหารสัตว์หมัก คือการนำเอาเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาหมักกับจุลินทรีย์	ลดต้นทุนการซื้ออาหารสัตว์ วัตถุดิบสำหรับทำ หรืออาหารเสริมสำหรับสัตว์ ขนาดใหญ่ เป็นมิตรต่อ สิ่งแวดล้อมอีกทั้งสัตว์ยัง ได้รับอาหารเสริมอย่างเพียงพอ	วัตถุดิบสำหรับทำ อาหารสัตว์ยังไม่ เพียงพอต่อความต้องการตลอดทั้งปี	Polsa et al, 2020

ถึงแม้จะมีวิธีการที่หลากหลายแต่เกษตรกรส่วนมากยังเลือกใช้วิธีการเผาในที่โล่งแจ้งเพื่อกำจัดขยะทางการเกษตรเหล่านั้น เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย ค่าใช้จ่ายน้อย และประหยัดเวลา แต่วิธีการนี้ส่งผลให้เกิดผลกระทบเชิงลบทางสุขภาพ โดยทำให้เกิดมลพิษทางอากาศ โดยเฉพาะช่วงเดือนธันวาคม – มีนาคมของทุกปี ประเทศไทยประสบปัญหาเรื่องฝุ่นละออง PM 2.5 สูงที่สุด (BBC News ไทย, 2566) จากปัญหาที่เกิดขึ้นจึงมีการส่งเสริมให้นำเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรกลับมาใช้ประโยชน์แทนการกำจัดที่ไม่ถูกต้อง ซึ่งวิธีการที่สามารถจัดการเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรในปริมาณมากได้อย่างรวดเร็วคือการนำมาผลิตเป็นอาหารสัตว์หมัก โดยอาศัยกระบวนการหมักที่เกิดจากการทำงานของจุลินทรีย์ อาหารสัตว์หมักเหล่านี้จึงมีโภชนาที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงสัตว์และสามารถเก็บได้เป็นระยะเวลานาน ต้นทุนต่ำกว่าอาหารสำเร็จรูปที่มีจำหน่ายในท้องตลาด แต่ทั้งนี้การผลิตอาหารสัตว์หมักต้นทุนต่ำจากเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรต้องคำนึงถึงวัตถุดิบในการผลิตด้วยเช่นกัน เพื่อลดต้นทุนในการขนส่ง จึงมีการส่งเสริมให้ใช้เศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีในพื้นที่และใช้วัตถุดิบหลากหลายเพื่อให้เกิดความมั่นคงทางอาหารสัตว์ หรือมีอาหารให้สัตว์ได้ตลอดทั้งปี งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นพัฒนากระบวนการหมักในการผลิตอาหารสัตว์หมักด้วยจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงเพื่อให้อาหารสัตว์หมักเกิดกระบวนการหมักที่รวดเร็วและมีโภชนาที่ดีสำหรับสัตว์

การผลิตอาหารสัตว์หมัก

อาหารสัตว์ คือ อาหารที่สัตว์กินเข้าไป เกิดกระบวนการย่อย และดูดซึมสารอาหารเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่าง ๆ อาหารหมักเป็นกระบวนการย่อยพืช เศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อเป็นอาหารแก่สัตว์เคี้ยวเอื้อง (กู่เกียรติ อัดตะวิริยะสุข, 2564) โดยอาหารสัตว์ถูกแบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ ได้แก่ อาหารหยาบ (Roughage) คือ อาหารที่มีเยื่อใยมากกว่าร้อยละ 18 และมีสารอาหารย่อยได้

ทั้งหมดน้อยกว่าร้อยละ 50 ได้แก่พวกพืชต่าง ๆ และอาหารหยาบนั้นยังสามารถแบ่งออกได้อีกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ อาหารหยาบแบบสด คือ อาหารที่มีความชื้นมากกว่าร้อยละ 85 มีลักษณะยังมีสีเขียวสดของพืชหรือหญ้า อาหารหยาบแห้ง คือ อาหารที่มีความชื้นต่ำกว่าร้อยละ 15 สามารถเก็บไว้ได้นาน และอาหารหยาบหมัก คือ พืชอาหารสัตว์ที่ถูกเก็บไว้โดยปราศจากออกซิเจน เพื่อให้เกิดจุลินทรีย์มีกลิ่นหอม อาหารข้น (concentrate) หมายถึง อาหารที่มีเยื่อไยน้อยกว่าร้อยละ 18 และมีสารอาหารย่อยได้สูง (สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน), มปป)

ค่าโภชนะอาหารสัตว์หลัก ได้แก่

ค่าน้ำหนักแห้ง (dry matter) คือ ค่าที่แสดงถึงปริมาณของวัตถุดิบในอาหารสัตว์ที่ไม่ใช่ น้ำ ได้แก่ ไขมัน โปรตีน แร่ธาตุ เป็นต้น ซึ่งเป็นค่าสำคัญในการคำนวณคุณค่าทางโภชนาอาหาร และการจัดสูตรอาหารสัตว์

โปรตีนหยาบ (crude protein; CP) คือ ปริมาณโปรตีนทั้งหมดในอาหาร เป็นโภชนาสำคัญสำหรับการเจริญเติบโต การสร้างกล้ามเนื้อ และการผลิตน้ำนมในสัตว์เคี้ยวเอื้อง ค่านี้นับบอกถึงคุณภาพของอาหารสัตว์โดยตรง

ค่าผนังเซลล์พืช (neutral detergent fiber; NDF) คือ เส้นใยที่ไม่ละลายในสารละลายที่เป็นกลาง ประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เป็นตัวชี้วัดปริมาณผนังเซลล์พืชทั้งหมด ค่า NDF สูงแสดงถึงปริมาณเส้นใยสูง ซึ่งมีผลต่อการกินได้ของสัตว์ (feed intake) โดยค่า NDF สูงจะทำให้สัตว์กินอาหารได้น้อยลง เนื่องจากใช้เวลาในการย่อยนานขึ้น

ค่าลิกโนเซลลูโลส (acid detergent fiber; ADF) คือ เส้นใยที่ไม่ละลายในสารละลายที่เป็นกรด ประกอบด้วยเซลลูโลสและลิกนิน (ไม่รวมเฮมิเซลลูโลส) ค่า ADF เป็นตัวชี้วัดที่สำคัญของความสามารถในการย่อยได้ของอาหาร ค่า ADF สูงแสดงถึงความสามารถในการย่อยได้ต่ำ ส่งผลให้พลังงานที่สัตว์ได้รับลดลง (กรมปศุสัตว์, 2559; MannaPro nurturing life; 2024; Saha et al, 2023)

กระบวนการย่อยอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง

การย่อยอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้องมี 4 กระเพาะ (สุนทร ตรีนันทวัน, 2553) (ภาพ

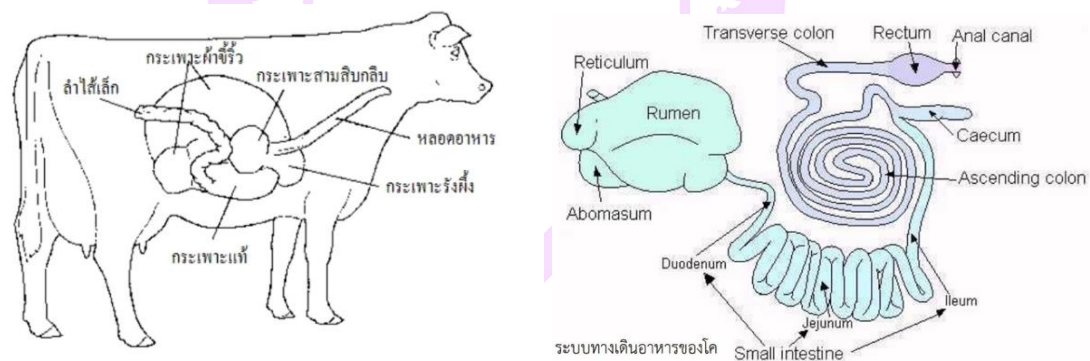
1) ได้แก่

กระเพาะที่ 1 รูเมน (Rumen) หรือ กระเพาะผ้าขี้ริ้ว เป็นกระเพาะส่วนแรกมีขนาดใหญ่ อาหารหรือหญ้าที่กินเข้าไปจะอยู่ในกระเพาะ และกระเพาะนี้ไม่มีเอนไซม์มาช่วยย่อยแต่มีจุลินทรีย์ต่าง ๆ มาช่วยย่อยในเบื้องต้น ต่อมาหญ้าที่กินรวมทั้งจุลินทรีย์ก็จะเคลื่อนมาที่กระเพาะที่ 2

กระเพาะที่ 2 เรติคิวลัม (Reticulum) หรือ กระเพาะรังผึ้ง ทำหน้าที่ขยอนเอาหญ้าที่จุลินทรีย์ช่วยย่อยมาแล้วในเบื้องต้นออกมาสู่ปากเพื่อเคี้ยวอีกครั้งเรียกว่า เคี้ยวเอื้อง แล้วหญ้าที่เคี้ยวเอื้องก็จะเคลื่อนไปสู่กระเพาะที่ 3

กระเพาะที่ 3 โอมาซุม (Omasum) หรือ กระเพาะสามสิบกลีบ ซึ่งภายในมีลักษณะเป็นแผ่นหลีบ ๆ ทับซ้อนกัน ทำหน้าที่กระจายอาหารให้เข้ากัน

กระเพาะที่ 4 อะโบมาซุม (Abomasum) หรือ กระเพาะแท้ อาหารหรือหญ้าที่ถูกย่อยมาก่อนแล้วตอนต้นพร้อมจุลินทรีย์ จะถูกเอนไซม์ต่าง ๆ หลายชนิดย่อยต่อไป ต่อจากกระเพาะแท็ก็น้ำลำไส้เล็ก ซึ่งที่ลำไส้เล็กนี้ก็จะมีการย่อยด้วยเอนไซม์อีกครั้ง อาหารที่ย่อยแล้วครั้งสุดท้ายก็จะแพร่เข้าสู่กระแสเลือดและถูกลำเลียงไปยังเซลล์ต่าง ๆ ทั่วร่างกาย

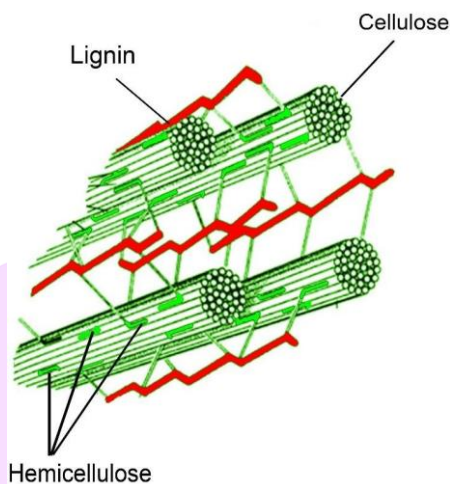


ภาพ 1 กระบวนการย่อยอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง

ที่มา: วรณเพ็ญ สุขเฉลิม, มปป.

การผลิตอาหารสัตว์หมักจากเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เป็นการหมักส่วนประกอบต่าง ๆ ของพืชด้วยจุลินทรีย์ ซึ่งจากการทำงานของจุลินทรีย์จะส่งผลให้โครงสร้างแข็งของพืชมีความอ่อนนุ่มหรือเปื่อยในระดับที่สัตว์รับประทานได้ และได้รับพลังงานและสารอาหารจากอาหารหมัก

เหล่านี้นั้นทั้งนี้องค์ประกอบของเซลล์พืชประกอบด้วย เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) (Lee et al, 2008) ดังแสดงในภาพ 2

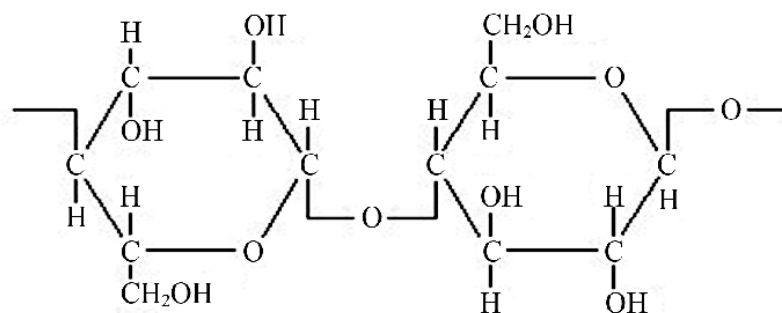


ภาพ 2 องค์ประกอบของผนังเซลล์วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

ที่มา: Mohammad et al, 2016

เซลลูโลส (cellulose)

มีสูตรโมเลกุล $(C_6H_{10}O_5)_n$ เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่เกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ และพบมากที่สุดผนังเซลล์พืช (Hinterstoisser and Salmen, 2000) เซลลูโลสเป็นโฮโมพอลิเมอร์ มีลักษณะเป็นเส้นตรง ไม่มีกิ่งก้าน มีหน่วยย่อยคือ เบต้า-ดี-กลูโคไพราโนส (β -D-Glucopyranose) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า 1,4 ไกลโคซิดิก (β -1,4-Glycosidic bond) (Eriksson et al, 1990) โครงสร้างของเซลลูโลส แสดงดังภาพ 3



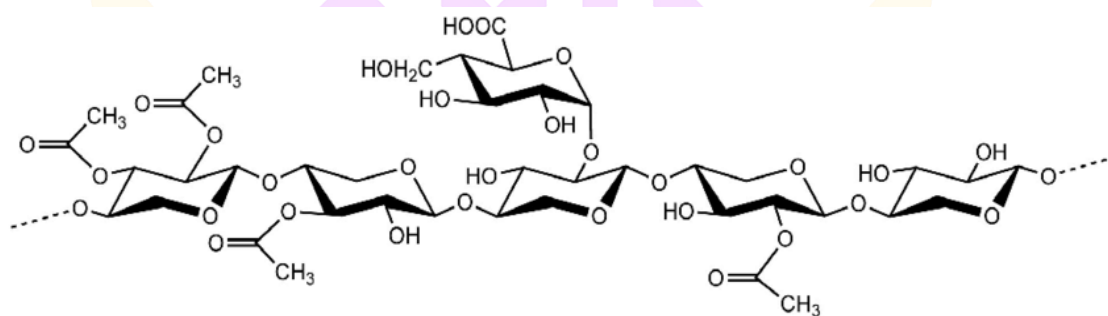
Cellulose

ภาพ 3 โครงสร้างของเซลลูโลส

ที่มา: Richards et al, 2012

เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose)

เฮมิเซลลูโลสพบมากที่สุดในผนังเซลล์พืชรองจากเซลลูโลส เป็นเฮเทอโรโพลิเมอร์ (Heteropolymer) ที่มีโครงสร้างการจัดเรียงตัวของสายโซ่โมเลกุลไม่เป็นระเบียบแต่มีโครงสร้างหลักคือ พอลิเมอร์ของน้ำตาลไซโลส ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ เบต้า 1,4 ไกลโคซิดิก (Anwar et al, 2014) ซึ่งถูกย่อยได้ง่ายด้วยกรดหรือเบสอ่อนและเอนไซม์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ (รัชพล พะวงศ์รัตน์, 2558) แสดงดังภาพ 4

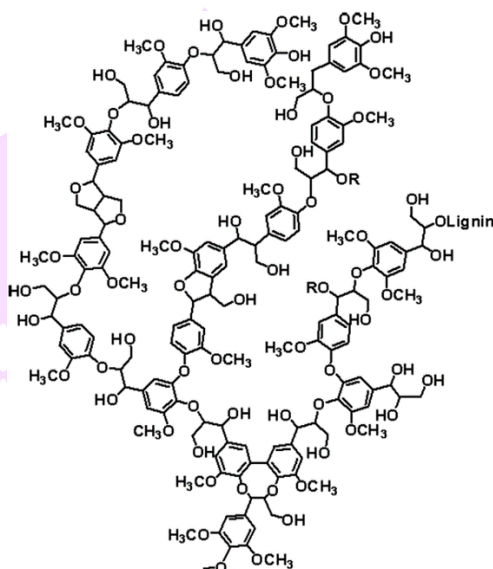


ภาพ 4 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส

ที่มา: Hu et al, 2020

ลิกนิน (lignin)

ลิกนินเป็นไบโอโพลิเมอร์ที่ทำหน้าที่สำคัญในโครงสร้างพืช โดยทำหน้าที่ยึดเกาะเส้นใยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเข้าด้วยกัน ส่งผลให้เนื้อเยื่อพืชมีความแข็งแรงและทนทานมากยิ่งขึ้น (Shah et al, 2023) แสดงภาพ 5



ภาพ 5 โครงสร้างทางเคมีของลิกนิน

ที่มา: Prieur et al, 2017

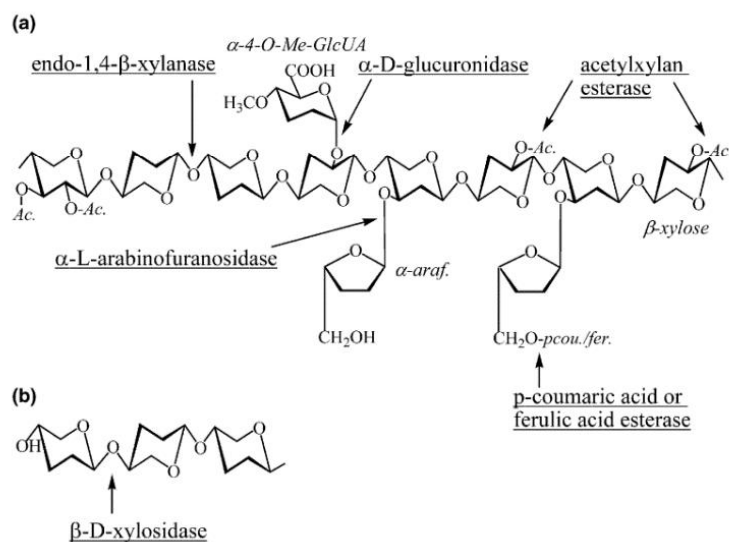
จากโครงสร้างของผนังเซลล์พืชหากต้องการทำให้มีความอ่อนนุ่มหรือทำให้เปื่อยยุ่ยต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต โดยเอนไซม์ในกลุ่มนี้จะทำการย่อยคาร์โบไฮเดรตให้กลายเป็นโมเลกุลของน้ำตาลซึ่งเอนไซม์ในกลุ่มนี้มีหลายชนิด ได้แก่ เอนไซม์อะไมเลส เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) เอนไซม์กลูคาเนส (glucanase) และเอนไซม์ไซลานเนส (xylanase) โดยเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีบทบาทในการย่อยที่แตกต่างกัน ในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไซลานเนสเนื่องจากเอนไซม์ชนิดนี้ทำหน้าที่ย่อยไซแลนซึ่งเป็นองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลส

เอนไซม์ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต

เอนไซม์จะทำการย่อยคาร์โบไฮเดรตให้กลายเป็นโมเลกุลของน้ำตาล ซึ่งมีเอนไซม์ในกลุ่มที่สามารถย่อยคาร์โบไฮเดรต เช่น เอนไซม์อะไมเลส (Amylase) จะเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลที่พันธะ 1,4-ไกลโคซิดิก ทำให้มีขนาดเล็กลง (Taniguchi and Honnda, 2009) เอนไซม์มอลเทส (maltase) ทำหน้าที่ย่อยมอลโทสให้เป็นกลูโคส เอนไซม์ซูเครส (sucrase) ทำหน้าที่ย่อยซูโครสให้เป็นกลูโคสและฟรุกโทส เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) ทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลสในผนังเซลล์พืช และเอนไซม์ไซลาเนสย่อยไซแลนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลไซโลส (Morgan, n.d.) เป็นต้น

เอนไซม์ไซลาเนส (xylanase)

ไซลาเนส เป็นเอนไซม์ในกลุ่มเฮมิเซลลูเลสที่ทำหน้าที่ย่อยไซแลนซึ่งเป็นส่วนประกอบของเซลล์พืช ไซลาเนสสามารถผลิตโดยเชื้อรา แบคทีเรีย ยีสต์ สาหร่ายทะเล โปรโตซัว หอยทาก ครัสเตเชียน แมลง เมล็ดพืช เป็นต้น (Bajpai, 2009) ไซลาเนสอาจถูกผลิตขึ้นในเชิงอุตสาหกรรมในการเพาะเลี้ยงของเหลวใต้น้ำ (submerged fermentation) หรือบนพื้นผิวที่เป็นของแข็ง และยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านอุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมอาหาร ผู้ผลิตไซลาเนสส่วนใหญ่ผลิตเอนไซม์เหล่านี้โดยใช้เทคนิคการหมักใต้น้ำ โดยมี β -1,4-xylan xylanohydrolase เร่งปฏิกิริยาการย่อยแบบสุ่มในสายพอลิเมอร์ของไซแลนที่มีแกนหลักเป็นน้ำตาลไซโลสซึ่งต่อกันด้วยพันธะเบต้า 1,4 linkage ซึ่งมีองค์ประกอบย่อย เช่น อะซิติก (acetyl), อะราบินโนซิแลน (arabinosyl) และ กลูคูโรโนซิล (glucuronosyl) (Patel and Prajapati, 2014) ดังภาพที่ 6



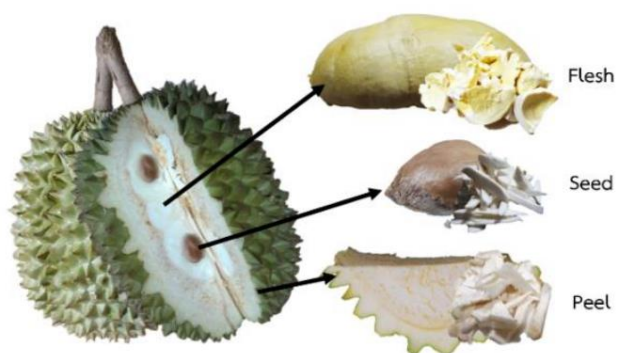
ภาพ 6 โครงสร้างของไซแลนและกลไกการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายไซแลน โดย (a) โครงสร้างของไซแลนและตำแหน่งที่ถูกโจมตีโดยเอนไซม์ย่อยสลายไซแลน และ (b) การย่อยสลายไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยเบต้าไซโลซิเดส

ที่มา: Collins et al, 2005

เศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

เปลือกทุเรียน

ในปี 2566 ประเทศไทยมีผลผลิตทุเรียนสูงถึง 1,480,382 ตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2566) ซึ่งส่งผลให้เกิดเปลือกทุเรียนและเศษวัสดุเหลือใช้ปริมาณมหาศาล อันเป็นปัญหาสำคัญที่ไม่สามารถกำจัดทิ้งได้โดยง่าย เปลือกทุเรียนมีส่วนประกอบของเซลลูโลสร้อยละ 57-64, เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 30.7 และลิกนินร้อยละ 13.6 (อภิตา บุญศิริ, 2559; Lubis et al, 2018)



ภาพ 7 โครงสร้างพื้นฐานวิทยาของทุเรียน

ที่มา: นรินทร์ เจริญพันธ์และคณะ, 2561

ขานอ้อย

ขานอ้อย (bagasse) คือ ส่วนของลำต้นที่ถูกหีบเอาน้ำอ้อยหรือจากกระบวนการผลิตน้ำตาลอ้อยจนเหลือแต่กากของลำต้นที่มีลักษณะแข็งและหยาบ มีการนำมาใช้ประโยชน์ต่าง ๆ ในภาคอุตสาหกรรมหรือเกษตรกรรม ซึ่งมีเซลลูโลสร้อยละ 45-55, เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 20-25, ลิกนินร้อยละ 18-24, เถ้าร้อยละ 1-4 และ ไข่น้อยกว่าร้อยละ 1 (เกษม สุขสถาน และชูลี ชัยพิพัฒน์, 2523)



ภาพ 8 ชานอ้อย

เปลือกข้าวโพด

เปลือกข้าวโพดประกอบด้วยเซลลูโลสร้อยละ 39.1 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 42.1 ลิกนินร้อยละ 9.1 โปรตีนร้อยละ 1.7 และเถ้าร้อยละ 1.2 (Barl et al, 1991) เปลือกข้าวโพดมีลักษณะเป็นแผ่นยาวประมาณ 10-20 เซนติเมตร ประกอบด้วยเส้นใยที่เกาะกันเป็นกลุ่ม (ภัทรานันท์ แวงวรรณและคณะ, 2560) เปลือกข้าวโพदनอกจากจะเป็นวัตถุดิบในการทำอาหารสัตว์หมักยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านต่าง ๆ เช่น งานหัตถกรรม ดอกไม้ประดิษฐ์ ตุ๊กตา งานด้านเสื้อผ้า และแพชั่น เป็นต้น (วัชร คตินนท์กุล และเจนจิรา ภูริรักษ์พิติกร, 2556; ฐานเศรษฐกิจ, 2565)



ภาพ 9 เปลือกข้าวโพด

การหมักอาหารสัตว์หมักด้วยเอนไซม์บริสุทธิ์จะมีต้นทุนสูงมาก การผลิตอาหารสัตว์ต้นทุนต่ำจึงอาศัยการทำงานของเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรตที่พบในแบคทีเรีย และสามารถส่งเสริมให้แบคทีเรียเหล่านั้นมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้นโดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เทคนิคหนึ่งที่เหมาะสมความสำเร็จในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในแบคทีเรีย คือเทคนิคพลาสมาเย็น

พลาสมา (Plasma)

พลาสมาคือสถานะที่ 4 ของสสารที่อยู่ในรูปของไอออน โดยให้พลังงานที่มากพอที่จะทำให้ก๊าซเกิดการแตกตัว เมื่อพลังงานส่งผ่านไปยังอิเล็กตรอนอิสระจะทำให้อิเล็กตรอนอิสระชนกันกับอะตอมและทำให้อิเล็กตรอนหลุดออกจากอะตอม เรียกกระบวนการนี้ว่า กระบวนการแตกตัวเป็นไอออน (ionization) ที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วทำให้จำนวนอิเล็กตรอนที่หลุดออกมามีจำนวนเพิ่มขึ้นจะทำให้แก๊สเกิดการแตกตัวและเปลี่ยนสถานะเป็นพลาสมา พลาสมาจะประกอบด้วยอนุภาคที่มีประจุบวกและลบในสัดส่วนที่ทำให้ประจุสุทธิเป็นศูนย์ นั่นคือมีสถานะเป็นกลางทางไฟฟ้า (อัจฉราภรณ์ บุญมา, 2556)

ประเภทของพลาสมา

ประเภทของพลาสมาสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ พลาสมาที่มีอยู่ตามธรรมชาติ (nature plasma) และพลาสมาที่สร้างขึ้นได้จากห้องปฏิบัติการ (laboratory plasma) ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ได้แก่ พลาสมาอุณหภูมิสูงหรือพลาสมาฟิวชัน (fusion plasma) และพลาสมาอุณหภูมิต่ำหรือแก๊สดีสชาร์จ (gas discharge) มีลักษณะการปล่อยประจุแบบอาร์คดีสชาร์จ (arc discharge) เมื่อให้กระแสไฟฟ้าแก่ขั้วอิเล็กโทรดจะทำให้เกิดความต่างศักย์ไฟฟ้าขึ้นระหว่างขั้วบวกและขั้วลบที่สูงจนกระตุ้นให้แก๊สบางส่วนเกิดการแตกตัวกลายเป็นประจุบวกและอิเล็กตรอนที่มีความหนาแน่นสูง อิเล็กตรอนจะถูกเร่งด้วยสนามไฟฟ้าที่อยู่ข้างหน้าขั้วลบ และเคลื่อนที่ไปชนกับอะตอมหรือโมเลกุลของแก๊สด้วยความถี่สูง เกิดการปล่อยประจุในลักษณะสปาร์ค (spark) ของประจุเป็นเส้นเล็ก ๆ จำนวนมาก (filament) ทำให้เกิดสถานะของพลาสมาที่มีความดันและพลังงานสูง โดยพลาสมาร้อนจะถูกสร้างที่ความดันใกล้เคียงหรือมากกว่าความดันบรรยากาศที่สามารถใช้ในการผลิตพลาสมาสเปรย์ หรือใช้ในการหลอม เชื่อมและตัดโลหะ ในส่วนของพลาสมาเย็น (cold plasma หรือ non-equilibrium plasma) มีลักษณะการปล่อยประจุแบบโกลว์ดีสชาร์จ (glow discharges) คือพลาสมาเย็นเป็นการใช้สนามไฟฟ้าดีสชาร์จตัวกลางอาจเป็นก๊าซหรือไอของเหลวจนเกิดเป็นอนุภาคหรืออนุมูลอิสระ จากนั้นจะสามารถแพร่ซึมผ่านตัวกลางไปทำปฏิกิริยาทางเคมี เช่น การออกซิไดซ์ (Oxidation) การรีดิวซ์ เป็นต้น เพราะหนึ่งในกระบวนการเคมีที่ใช้ในการย่อยสลาย (decompose) มักใช้อนุมูลไฮดรอกซิล (OH) เป็นหลัก และพลาสมาเย็นสามารถสร้างอนุมูลชนิดนี้ทดแทนการใช้สารเคมีแบบดั้งเดิมได้เป็นอย่างดี และเพื่อให้สะดวกในการผลิตและนำไปใช้งาน อนุมูลพลาสมาเย็นมักผลิตได้ 3 วิธีคือ ดีสชาร์จเหนือผิวของเหลวอาจใช้วิธี เจ็ทพลาสมา ดีสชาร์จโคโรนา โกลดิงอาร์ค และดีสชาร์จข้ามฉนวน (DBD) ในการผลิตอนุมูล อาทิ อะตอมออกซิเจน (O) ไฮดรอกซิล ($\cdot\text{OH}$) โอโซน (O_3) ไนโตรเจนออกไซด์ (NO) ก่อนที่อนุมูลพลาสมาเหล่านี้จะแพร่ซึมสู่ผิวด้านบนของเหลว แล้วจึงละลายในเนื้อของเหลว สำหรับเทคนิคพลาสมา DBD จะผลิตอนุมูลพลาสมาหลักๆคือ ไฮดรอกซิล ซึ่งมีอายุสั้นระดับนาโนวินาที เมื่ออนุมูลนี้แพร่ซึมห่างจากบริเวณที่เป็นสถานะพลาสมา จะรวมกลับเป็นอนุภาคที่มีอายุยาว อาทิ อนุมูลไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นรูปโมเลกุลเสถียร พร้อมทั้งจะทำการออกซิไดซ์ต่อสารอินทรีย์ได้ ดีสชาร์จในของเหลว และดีสชาร์จไอของเหลว (ฉันทา รัตน์และอรุณพล เขยสุเกตุ, 2560; สมาคมฟิสิกส์ไทย, 2019)

ระบบผลิตพลาสมา

การผลิตพลาสมาความดันบรรยากาศเป็นที่นิยม เนื่องจากมีค่าใช้จ่ายน้อยกว่าการผลิตพลาสมาภายใต้สภาวะสุญญากาศ ซึ่งการผลิตพลาสมาที่ความดันบรรยากาศมี 2 ระบบ (นันทนริญ พิสิฐรัชต์, 2560) คือ ระบบผลิตพลาสมาที่ความดันบรรยากาศแบบไดอิเล็กตริกแบรีเออร์ (Dielectric barrier discharge: DBD) ประกอบด้วยส่วนเครื่องกำเนิดไฟฟ้าความต่างศักย์สูง ความถี่ปานกลาง และห้องกำเนิดพลาสมา ระบบนี้มีข้อได้เปรียบกว่าระบบผลิตพลาสมาทั่วไปนั้น คือสามารถจุดพลาสมาในความดันบรรยากาศได้และไม่ต้องการปั๊มสุญญากาศซึ่งมีราคาแพง ดังนั้นจึงถูกนำไปประยุกต์ใช้ในระบบอุตสาหกรรมได้เป็นอย่างดี โดยหลักการเบื้องต้นของพลาสมาแบบไดอิเล็กตริกแบรีเออร์ที่ความดันบรรยากาศ คือ จะใช้ความต่างศักย์ระหว่างขั้วไฟฟ้าจุดพลาสมา โดยขั้วไฟฟ้าจะถูกคั่นหรือปิดคลุมโดยวัตถุไดอิเล็กตริก เพื่อป้องกันการอาร์คของพลาสมาซึ่งจะทำให้วัตถุไดอิเล็กตริกถูกทำลาย (Tendero et al, 2006) ระบบผลิตพลาสมาที่ความดันบรรยากาศแบบลำพลาสมา (Atmospheric pressure plasma jet: APPJ) การสร้างพลาสมาแบบพลาสมาเจ็ตจะใช้แหล่งกำเนิดเป็นคลื่น ความถี่วิทยุ (radio frequency) การสร้างพลาสมาแบบนี้อุปกรณ์จะมีขนาดเล็ก ($L < 20$ เซนติเมตร) และใช้คลื่นวิทยุพลังงานต่ำ ซึ่งจะเห็นได้ว่าส่วนประกอบสำคัญ คือ อิเล็กโทรด (electrode) ซึ่งมีอยู่ 2 ส่วน คือ อิเล็กโทรดส่วนแรกต่อเข้ากับแหล่งกำเนิดคลื่นวิทยุ (RF electrode) และอีกส่วนหนึ่งต่อเข้ากับสายดิน (grounded electrode) คลื่นวิทยุที่ใช้มีความต่างศักย์ระหว่าง 100 – 150 โวลต์ แก๊สที่ถูกไอออไนซ์จะวิ่งผ่านหัวฉีดโดยให้แก๊สมืออัตราการไหล 12 ลิตรต่อนาที ซึ่งพลังงานหัวฉีดที่ต่ำแบบนี้จะช่วยให้ประจุพลาสมาที่ได้มีความเสถียรและป้องกันการเกิดอาร์คพลาสมา (Lim et al, 2015) เนื่องจากพลาสมาเย็นเป็นเทคโนโลยีที่สะอาด ไม่มีสารตกค้างในสิ่งแวดล้อม สามารถสร้างได้รวดเร็ว (Ling et al, 2014) และการใช้เทคโนโลยีพลาสมาในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรมกันอย่างแพร่หลาย

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากงานวิจัยของ Liu et al, (2006) ได้ระบุว่า *Aspergillus niger* สามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสที่ซึ่งทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และค่า pH เท่ากับ 5 และสามารถย่อย birchwood xylan และรำข้าวสาลีได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งมีงานวิจัยของ Jalal et al, (2009) รายงานว่า เอนไซม์ไซลานเนสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* R5 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มีสถานะที่

เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส และค่า pH เท่ากับ 6 จากงานวิจัยของ Ko et al, (2009) ได้ระบุว่ายีสเอนไซม์จากแบคทีเรีย *Paenibacillus campinasensis* BL11 มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และค่า pH เท่ากับ 7 Zhang, (2015) ได้ระบุว่าเทคนิคพลาสมาเย็นสามารถกระตุ้นการละลายพันธะของแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* และงานวิจัยของ Kouzonis et al, (2021) ได้ค้นพบว่าการใช้เอนไซม์สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอาหารและความสามารถในการหมักของอะราบิโนไซแลนในอาหารที่มีข้าวสาลีเป็นส่วนประกอบหลัก อย่างไรก็ตามการตอบสนองต่อการหมักด้วยเอนไซม์ของอาหารที่มีข้าวโพดเป็นส่วนประกอบหลักอาจมีความสัมพันธ์กับความทนทานของอะราบิโนไซแลน รวมถึงคุณค่าทางโภชนาการที่สูงของข้าวโพด ต่อมา Egbune et al, (2021) ทดสอบการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสโดยใช้หญ้าเนเปียร์เป็นวัตถุดิบในการหมักแบบแบบแห้ง (solid-state fermentation) กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด ผลลัพธ์เหล่านี้บ่งชี้ว่าการหมักในสถานะของแข็งช่วยเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของหญ้าเนเปียร์ ซึ่งสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตไซแลนเนส

Sangwijit et al, (2015) ได้ทดสอบการเกิดการละลายพันธะด้วยเทคนิคพลาสมา กับแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสสูงกว่าชุดควบคุม นอกจากนี้ซึ่งงานวิจัยของ Laksuk et al, (2019) ได้ศึกษาการชักนำดีเอ็นเอเปลี่ยนให้เกิดการละลายพันธะด้วยเทคโนโลยีพลาสมาความดันบรรยากาศ โดยผู้วิจัยได้ใช้แบคทีเรียเรืองแสงสีเขียวถ่ายโอนเข้าสู่เวกเตอร์ จากนั้นทำการอาบพลาสมาอาร์กอนและฮีเลียม พบว่าแบคทีเรียที่มีการอาบพลาสมาอาร์กอน 15 นาที พบการละลายพันธะโดยการเพิ่มขึ้นของนิวคลีโอไทด์ (insertion) และการแทนที่คู่เบส (substitution) มากที่สุด และจุลินทรีย์ที่ถูกชักนำให้เกิดการละลายพันธะสามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสให้มีประสิทธิภาพการทำงานเพิ่มมากขึ้น โดยมีรายงานการวิจัยของ Polska et al, (2020) ได้ทดลองการทำลายพันธะด้วยเทคนิคพลาสมาความดันบรรยากาศพบว่ามีกรการละลายพันธะของแบคทีเรีย *B. subtilis* มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ดีขึ้นถึง 4 เท่า และมีการแทนที่ของกรดอะมิโนจากทรีโอนีนเป็นซีรีนทำให้ตำแหน่งกรดอะมิโนมีการเปลี่ยนแปลงซึ่งทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ดีขึ้น

งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไซแลนเนสของแบคทีเรียเพื่อนำใช้ในการผลิตอาหารสัตว์หมักต้นทุนต่ำ ตามความต้องการของวิสาหกิจชุมชนเพียวพลัสฟาร์ม โดยใช้เปลือกทุเรียน ชานอ้อยและเปลือกข้าวโพด ซึ่งเป็นวัตถุดิบในพื้นที่ที่หาได้ง่ายและมีปริมาณมาก

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมี

อุปกรณ์

- จานเพาะเชื้อ (plate)
- ปิเปต (pipette)
- หลอดทดลอง (test tube)
- สำลี (cotton)
- หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (1.5 mL microcentrifuge tube)
- หลอดพีซีอาร์ (PCR tube)
- คิวเวทท์ (cuvette)
- ปิเปตทิป (pipette tip)
- พาราฟิล์ม (parafilm)
- ขวดใส่สาร (laboratory bottle) ยี่ห้อ Duran
- กระดาษกรอง (filter paper) ยี่ห้อ Whatman
- กระบอกตวง (cylinder)
- ไม้จิ้มฟัน (toothpick)
- แท่งแก้วสามเหลี่ยม (spreader)
- ห่วงเชี่ยเชื้อ (loop)
- ช้อนตักสาร (spatula)

กระดาษชั่งสาร (weighing paper)

ไมโครเพลทแบบหลุมตัวอย่าง 96 ช่อง (96 well plate)

เครื่องมือ

BluPAD Dual LED Blue/White Light Transilluminator

กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope)

เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (centrifuge)

เครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า (electrophoresis)

เครื่องส่งถ่ายสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า รุ่น BIO-RED (BIO-RED micropulser electroporator)

เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine)

เครื่องชั่งสาร 4 ตำแหน่ง (analytical balance)

เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)

เครื่องส่องเจลแบบไฟ LED (BluPAD Dual LED Blue/White Light Transilluminator)

เครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)

เครื่องเขย่าเชื้อ (incubator shaker)

เครื่องเขย่าสาร (vortex mixer)

เครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท รุ่น Multiskan SkyHight

เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

ตู้อบเชื้อ (incubator)

ตู้ปลอดเชื้อ (bioclean wooden)

อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

สารเคมี

3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS)

642 BamHI primer

642 HindIII primer

Agar

Agarose gel

Bacto-tryptone

Beechwood xylan

Bovine Serum Albumin Standard Set (BSA)

Bradford reagent

Chloroform (CHCl_3)

Citrate buffer pH 4, 0.05 M

Citric acid ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)

Dipotassium phosphate (K_2HPO_4)

Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)

Distilled water

Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)

Ethidium bromide

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 2 mM

Fast digest *Bam*HI ยี่ห้อ Thermo Scientific

Fast digest *Hind*III ยี่ห้อ Thermo Scientific

Glycerol ($C_3H_8O_3$)

Glycine ($C_2H_5NO_2$)

Hydrogen chloride (HCl)

Isopropanol (C_3H_8O)

Lysozyme

Magnesium sulfate ($MgSO_4$)

PCR grade water

Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)

Sodium acetate ($C_2H_3NaO_2$)

Sodium chloride (NaCl)

Sodium hydroxide (NaOH)

Sodium potassium tartrate ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$)

Taq DNA polymerase ยี่ห้อ vivantis

Taq DNA polymerase ยี่ห้อ KOD Neo Plus

TBE buffer (Tris-borate-EDTA)

Tris-HCl 20mM pH 8

Tris Base ($C_4H_{11}NO_3$)

Triton X-100 1.2%

T4 DNA ligase ยี่ห้อ Thermo Scientific

วิธีดำเนินงานวิจัย

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ครั้งที่ 2 ของแบคทีเรียพันธุ์กลาย *B. subtilis* MT3.4 ด้วยเทคนิคพลาสมาเย็น

การเตรียมตัวอย่างแบคทีเรียพันธุ์กลาย *B. subtilis* MT3.4 และทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ไโซลานเนส

เพาะเลี้ยง *B. subtilis* MT3.4 ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านชีววิศวกรรมพลาสมา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา ลงในอาหารเหลว Luria-Bertani broth (LB) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าความขุ่นโดยวัดที่ค่าดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร ให้ได้เท่ากับ 1.0 จากนั้นปั่นเก็บเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสเหนือตะกอน (supernatant) หรือเอนไซม์หยาบ (crude enzyme) ที่ได้ไปทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ไโซลานเนสด้วยวิธี Dinitro salicylic Acid Method (Miller, 1959)

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ครั้งที่ 2

เตรียม *B. subtilis* MT3.4 เลี้ยงในอาหารเหลว LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าความขุ่นโดยวัดที่ค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้ได้เท่ากับ 1.0 จากนั้นนำแบคทีเรียอาบด้วยพลาสมาอาร์กอนฮีเลียม โดยแบ่งระยะเวลาออกเป็น 4 ระยะเวลา ได้แก่ 1, 2, 3 และ 5 นาที ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้กำเนิดพลาสมา 85 โวลต์ อัตราการไหลของแก๊ส 2 ลิตรต่อนาที ดังภาพ 10



ภาพ 10 พลาสมาเย็น

การคัดเลือก *B. subtilis* พันธุ์กลาย ที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ครั้งที่ 2

การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส

นำแบคทีเรีย *B. subtilis* พันธุ์กลายครั้งที่ 2 ที่ผ่านการอาบพลาสมาทุกเงื่อนไข และแบคทีเรียที่ไม่ผ่านการอาบพลาสมา (ชุดควบคุม) เลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ 10^{-4} เลี้ยงแบคทีเรียด้วยวิธี spread plate บนอาหารแข็ง Luria-Bertani agar (LA) จากนั้นนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารและคำนวณอัตราการรอดชีวิตโดยคำนวณจากสูตร

$$\text{อัตราการรอดชีวิต (\%)} = \frac{R_T}{R_0} \times 100$$

โดย

R_0 คือจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่ไม่ผ่านการอาบพลาสมา (ชุดควบคุม)

R_T คือจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่ผ่านการอาบพลาสมา (Polsa et al. 2020)

จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรีย *B. subtilis* พันธุ์กลายครั้งที่ 2 เลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และนำส่วนใสเหนือตะกอน (supernatant) หรือเอนไซม์หยาบ (crude enzyme) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับ 1% Beechwood Xylan ใน Citrate buffer pH 5 ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสด้วยวิธี DNS (Miller, 1959) วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องเครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท รุ่น Multiskan SkyHigh และคำนวณกิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานไซโลส (ภาคผนวก ค) แล้วคัดเลือกไอโซเลทที่แสดงค่ากิจกรรมสูงหรือต่ำกว่าชุดควบคุมนำไปศึกษาต่อไป

การวัดปริมาณของโปรตีน

วัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford (Bradford M., 1976) โดยเติมสารละลาย Bradford dry reagent 500 ไมโครลิตร กับเอนไซม์หยาบ 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร บันทึกผลการทดลองที่ได้ และคำนวณค่าปริมาณโปรตีนโดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA (ภาคผนวก ค)

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซลานเนสและโครงสร้างโปรตีนของเอนไซม์ ไซลานเนสจากแบคทีเรียพันธุ์กลายครั้งที่ 2

การโคลนยีนไซลานเนส (Xylanase gene cloning)

การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียพันธุ์ดั้งเดิม (*B. subtilis*), แบคทีเรียพันธุ์กลาย (*B. subtilis* MT3.4) และแบคทีเรียพันธุ์กลายครั้งที่ 2 ที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสสูงที่สุด (*B. subtilis* MT2-428) ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิตร บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปิดสารแขวนลอยเซลล์ปริมาตร 1400 ไมโครลิตรลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวส์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและเติม lysis buffer 400 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เติมน้ำ 5M NaCl 132 ไมโครลิตร ผสมเข้าด้วยกัน นำไปทำให้แข็งโดยใช้ไนโตรเจนเหลวและนำไปต้มในน้ำเดือด 3 นาที (freeze and thaw) ทำซ้ำ 3 รอบ รอให้เย็นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสเหนือตะกอน 400 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวส์หลอดใหม่ เติมน้ำคลอโรฟอร์ม (chloroform) 400 ไมโครลิตร ผสมเข้าด้วยกันนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสเหนือคลอโรฟอร์ม 300 ไมโครลิตร เติมน้ำไอโซโพรพานอล (isopropanol) 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้ง เติมน้ำเอทานอล (ethanol) 200 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิ 4

องศาเซลเซียส จากนั้นเทส่วนใสทิ้งและคว่ำหลอดทิ้งไว้ให้แห้งในอุณหภูมิห้อง (air dry) เป็นเวลา 20 นาที เติมน้ำเกรดพีซีอาร์ 20 ไมโครลิตร จากนั้นตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธี Gel electrophoresis ใช้เจลที่ความเข้มข้น 1.2%

การวิเคราะห์ความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอของ *B. subtilis* MT3.4

และ *B. subtilis* MT2-428 ด้วยเทคนิค HAT-RAPD

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีข้างต้นมาทดสอบความเปลี่ยนแปลงระดับดีเอ็นเอด้วยเทคนิค HAT-RAPD ใช้ *Taq* DNA polymerase ของ vivantis โดยใช้ไพรเมอร์แบบคู่ 5 ไพรเมอร์ ดังตาราง 2 จากนั้นเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลา
ขั้นที่ 1 Pre-denaturing	94	3 นาที
ขั้นที่ 2 Denaturing	94	45 วินาที
ขั้นที่ 3 Annealing	46	30 วินาที
ขั้นที่ 4 Extension	72	5 นาที
ขั้นที่ 5 Final extension	12	1 นาที

โดยทำซ้ำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 34 รอบ จากนั้นตรวจสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์ของพีซีอาร์ โดยเทคนิค Gel electrophoresis ใช้เจลอะกาโรสที่ความเข้มข้น 1.2%

ตาราง 2 ไพรเมอร์แบบคู่และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
OPAZ12	5' GATGGGCCTG 3'
OPH15	5' AATGGCGCAG 3'
OPAT13	5' CTGGTGGAAG 3'
OPC06	5' GAACGGACTC 3'
OPAY03	5' TTTCCGGGAG 3'

การเพิ่มปริมาณยีนไซลาเนสด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR)

นำดีเอ็นเอของแบคทีเรียพันธุ์ดั้งเดิม (*B. subtilis*), แบคทีเรียพันธุ์กลายครั้งที่ 1 (*B. subtilis* MT3.4) และแบคทีเรียพันธุ์กลายครั้งที่ 2 (*B. subtilis* MT2-428) มาเป็นแม่แบบสำหรับการโคลนยีนไซลาเนส (Maniatis et al, 1982) ผสมกับส่วนผสมสำหรับ PCR ดังตาราง 3

ตาราง 3 ส่วนผสมสำหรับพีซีอาร์เพิ่มปริมาณยีนไซลาเนส

องค์ประกอบ	ความเข้มข้นที่ต้องการ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
10x PCR buffer	1x	2
2 mM dNTPs	0.2 mM	0.6
แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO ₄)	1 mM	0.4
F642BamHI (Forward Primer)	10 pmol/μL	0.5
R642HindIII (Reverse Primer)	10 pmol/μL	0.5
Taq DNA polymerase	1 U	0.2
DNA	<200 ng	0.5
dH ₂ O for PCR		15.4
ปริมาตรรวม		20

โดย Taq DNA polymerase ที่ใช้คือ KOD Plus และไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR ได้แก่ F642BamHI (3' AGGAGGGGATCCATGTTTAAGTTTAAAAAG 5') และ R642HindIII (5' AAAGATAAGCTTTTACCACACTGTTACATT 3') จากนั้นนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) โดยโปรแกรมการทำงานดังนี้

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลา
ขั้นที่ 1 Pre-denaturing	95	2 นาที
ขั้นที่ 2 Denaturing	95	30 วินาที
ขั้นที่ 3 Annealing	58	15 วินาที

ขั้นที่ 4 Extension	68	30 วินาที
ขั้นที่ 5 Final extension	68	5 นาที

โดยทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 – 4 จำนวน 34 รอบ จากนั้นตรวจสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์ของพีซีอาร์ โดยเทคนิค Gel electrophoresis ใช้เจลอะกาโรสที่ความเข้มข้น 1.2%

การศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของยีนไฮลานเนสจากแบคทีเรีย *B. subtilis* MT2-428 ที่ได้เปรียบเทียบกับ *B. subtilis* MT3.4 โดยการแสดงออกของยีน (over expression)

การเตรียมเซลล์คอมพิเทนท์ (competent cell)

เพาะเลี้ยง *Escherichia coli* DH5 α ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเซลล์ด้วยความเร็ว 1 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมงหรือวัดค่าความขุ่นที่ค่าดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร ให้ได้เท่ากับ 0.4-0.5 จากนั้นแช่เซลล์ในถังน้ำแข็ง 30 นาที แบ่งใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1,400 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,800 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้งและเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 1,000 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,800 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งทำขั้นตอนเดิมซ้ำอีกรอบและเติม 10% กลีเซอรอลที่ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,800 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทดสอบคุณภาพของเซลล์คอมพิเทนท์โดยใช้พลาสมิดที่ไม่ผ่านการตัดเอนไซม์ ถ่ายโอนลงเซลล์คอมพิเทนท์ด้วยวิธี electroporation ด้วยเครื่อง MicroPulser Electroporator เติมหาอาหารเหลว LB 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี spread plate บนอาหารแข็ง LB ที่ประกอบด้วยแอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อดูประสิทธิภาพของเซลล์คอมพิเทนท์สำหรับการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมต่อไป

การเชื่อมเวกเตอร์และดีเอ็นเอ (ligation)

นำเวกเตอร์ pETDuet-1 และยีนไซลาเนสของ *B. subtilis*, *B. subtilis* MT3.4 และแบคทีเรียพันธุ์กลาย MT2-428 นำมาตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Hind*III ส่วนผสมที่ใช้ดังตาราง 4

ตาราง 4 ส่วนผสมของขั้นตอนการตัดเอนไซม์

องค์ประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
10x Buffer	2
เอนไซม์ <i>Bam</i> HI	1
เอนไซม์ <i>Hind</i> III	1
DNA or Vector	5
dH ₂ O for PCR	11
ปริมาตรรวม	20

นำไปป้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นตรวจสอบคุณภาพของพลาสมิดและดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์วิธีการ Gel electrophoresis ใช้เจลที่ความเข้มข้น 1.2% จากนั้นนำพลาสมิดและดีเอ็นเอมาเชื่อมเข้าด้วยกันเอนไซม์ไลเกส (ligase) (Thermo scientific) ส่วนผสมดังตาราง 5

ตาราง 5 ส่วนผสมการเชื่อมพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) ด้วยวิธี T4 ligation

องค์ประกอบ	ความเข้มข้น
10x T4 DNA Ligase Buffer	2 μ L
T4 DNA Ligase	1 Weiss U
DNA	1:1 to 5:5 molar ratio over vector
Vector	20 – 100 ng
dH ₂ O for PCR	To 20 μ L
ปริมาตรรวม	20 μ L

บ่มพลาสมิดลูกผสมที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อเตรียมทำการส่งถ่ายลงในเซลล์คอมพิเทนท์ต่อไป

การส่งถ่าย (transformation) พลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) ลงในเซลล์คอมพิเทนท์

นำพลาสมิดลูกผสมจากวิธีการข้างต้นกับเซลล์คอมพิเทนท์ ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่ในน้ำแข็ง 15 นาที จากนั้นส่งถ่ายด้วยวิธี electroporation ด้วยเครื่อง MicroPulser Electroporator เติมหาอาหารเหลว LB 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี spread plate บนอาหารแข็ง LB ที่ประกอบด้วยแอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม จากนั้นนำเซลล์ลูกผสมเลี้ยงลงในอาหารเหลว LB และสกัดพลาสมิดเพื่อตัดเช็คยีนและพลาสมิดเพื่อความถูกต้อง

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียพันธุ์ *B. subtilis* MT2-428

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีนไฮลาเนสของ *B. subtilis* MT2-428 ไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนของยีนด้วยวิธี sanger sequencing จากนั้นเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย *B. subtilis* MT2-428 โดยใช้โปรแกรม NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

การเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง *B. subtilis*, *B. subtilis* MT3.4 และแบคทีเรีย MT2-428

เปรียบเทียบความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ *B. subtilis* พันธุ์ดั้งเดิม *B. subtilis* MT3.4 และ *B. subtilis* MT2-428 ด้วยโปรแกรม Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)

การเปรียบเทียบโครงสร้างโปรตีน 3 มิติของเอนไซม์ไลลาเนส

วิเคราะห์เปรียบเทียบโครงสร้างสามมิติ (3-D) ของเอนไซม์ไลลาเนส ของ *B. subtilis*, *B. subtilis* MT3.4 และ *B. subtilis* MT2-428 โดยสร้างแบบจำลองด้วยโปรแกรม SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ไลลาเนส

การศึกษาค่ากรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลลาเนส

นำโคโลนีของแบคทีเรียลูกผสม *B. subtilis* MT2-428 จากขั้นตอนการคัดเลือกแบคทีเรียพันธุ์กลายครั้งที่ 2 เลี้ยงลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเก็บเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และนำส่วนใสเหนือตะกอน ปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลลาเนสด้วยวิธี DNS โดยใช้ 1% beechwood xylan ในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่างกันตั้งแต่ 3-10 ที่ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ และบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นวัดกิจกรรมเอนไซม์ไลลาเนสที่เกิดขึ้นจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ด้วยวิธี DNS คำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลลาเนส โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลายไซโลส (ภาคผนวก ค)

การศึกษาค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลลาเนส

เลี้ยงแบคทีเรียลูกผสม *B. subtilis* MT2-428 จากขั้นตอนการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเก็บเซลล์ด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และนำเอนไซม์หยาบที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง ปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลลาเนสด้วยวิธี DNS บ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกันตั้งแต่ 30-100 องศาเซลเซียส

การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ไลลาเนสที่ความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ ต่างกัน

การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ไลลาเนสที่ความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิ ดัดแปลงมาจากการวิจัยของ Xiang et al, (2019) การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ไลลาเนสที่สภาวะกรด-ด่างที่ต่างกันจะนำเอนไซม์หยาบผสมกับบัฟเฟอร์ที่มีค่ากรด-ด่างต่าง ๆ ตั้งแต่ 3-10 บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง และการทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ไลลาเนสที่อุณหภูมิแตกต่างกัน โดยนำเอนไซม์หยาบบ่มที่อุณหภูมิที่แตกต่างกันตั้งแต่ 30-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำเอนไซม์หยาบภายใต้เงื่อนไขต่าง ๆ ไปวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลลาเนสด้วยวิธี DNS และคำนวณกิจกรรมเอนไซม์ไลลาเนสโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานไซโลส และนำมาคำนวณค่ากิจกรรมสัมพัทธ์โดยคำนวณจากสูตร (Tabstri et al, 2016)

$$\text{Relative activity (\%)} = \frac{(\text{ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ต้องการทราบ} \times 100)}{\text{ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด}}$$

การผลิตอาหารสัตว์หมักจากเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรด้วยแบคทีเรียพันธุ์กลาย ที่ถูกคัดเลือกในระดับห้องปฏิบัติการ

การทดสอบการย่อยวัตถุดิบของแบคทีเรียพันธุ์กลายที่ถูกคัดเลือก

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis*, แบคทีเรีย *B. subtilis* MT3.4 และแบคทีเรีย *B. subtilis* MT2-428 ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมวัตถุดิบเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ได้แก่ ขานอ้อย เปลือกทุเรียน และเปลือกข้าวโพด สำหรับทดสอบความสามารถในการย่อยวัตถุดิบทั้ง 3 ชนิดของแบคทีเรีย โดยนำวัตถุดิบทั้ง 3 ชนิดทำ pre-treatment โดยนำวัตถุดิบเข้าเครื่องนึ่งความดันไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำ 2 รอบ และนำไปอบที่ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาใส่ขวดดูแรนขนาด 500 มิลลิลิตร น้ำหนักที่ใช้ทดสอบคือร้อยละ 1 ของน้ำหนักแห้งของแต่ละวัตถุดิบโดยเติมน้ำกลั่นที่มีปริมาตร 200 มิลลิลิตรและเติมสารแขวนลอยของแบคทีเรียให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 5 เขย่าให้เข้ากันและทำการหมักเป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างเอนไซม์หยาบตั้งแต่วันที่ 0 - 7 เพื่อนำไปทดสอบการย่อยวัตถุดิบโดยการตรวจสอบปริมาณน้ำตาลที่ถูกปลดปล่อยออกมาด้วยวิธี DNS

การผลิตอาหารสัตว์หมักจากเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

นำแบคทีเรีย *B. subtilis* MT2-428 และ *B. subtilis* MT3.4 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไฮลาเนสเลี้ยงในอาหารเหลว LB กลุ่มผลิตแลคติก *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ LAB 57MT เลี้ยงในอาหารเหลว LACTOBACILLUS MRS AGAR (MRS agar) กลุ่มยีสต์สายพันธุ์ VII16-15 เลี้ยงในอาหารเหลว YPD (Yeast extract Peptone Dextrose agar) และกลุ่มแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ MT B4 ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเลี้ยงในอาหารเหลว LB จากนั้นนำทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของแบคทีเรียโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.0 จากนั้นถ่ายเชื้อแบคทีเรียลงในขวดรูปชมพู่ที่มีน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตรบรรจุอยู่โดยใช้อัตราส่วนเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกผสมกับวัตถุดิบดังตาราง 6

ตาราง 6 ส่วนผสมในการทำอาหารสัตว์หมัก

	วัตถุดิบ	กลุ่มจุลินทรีย์
กลุ่มชุดควบคุม	เปลือกทุเรียน ขนาด 1-2 นิ้ว หน้า 1 กิโลกรัม	กลุ่มจุลินทรีย์ผลิตแลคติก
	ชานอ้อย ขนาด 3-4 นิ้ว หน้า 0.3 กิโลกรัม	กลุ่มยีสต์
	เปลือกข้าวโพด ขนาด 3-4 นิ้ว หน้า 0.3 กิโลกรัม	กลุ่มจุลินทรีย์ผลิตเซลลูเลส น้ำเปล่า
กลุ่ม <i>B. subtilis</i> MT3.4	เปลือกทุเรียน ขนาด 1-2 นิ้ว หน้า 1 กิโลกรัม	กลุ่มจุลินทรีย์ผลิตแลคติก
	ชานอ้อย ขนาด 3-4 นิ้ว หน้า 0.3 กิโลกรัม	กลุ่มยีสต์
	เปลือกข้าวโพด ขนาด 3-4 นิ้ว หน้า 0.3 กิโลกรัม	กลุ่มจุลินทรีย์ผลิตเซลลูเลส
กลุ่ม <i>B. subtilis</i> MT2-428	เปลือกทุเรียน ขนาด 1-2 นิ้ว หน้า 1 กิโลกรัม	กลุ่มจุลินทรีย์ผลิตแลคติก
	ชานอ้อย ขนาด 3-4 นิ้ว หน้า 0.3 กิโลกรัม	กลุ่มยีสต์
	เปลือกข้าวโพด ขนาด 3-4 นิ้ว หน้า 0.3 กิโลกรัม	กลุ่มจุลินทรีย์ผลิตเซลลูเลส

ส่วนผสมทั้งหมดบรรจุอยู่ในถุงหมัก จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง และบันทึกผลโดยการเก็บตัวอย่าง ภายหลังจากการหมัก 0, 7, 30 และ 60 วัน เก็บตัวอย่างของเหลวในถุงหมักปริมาตร 20 มิลลิลิตรลงในหลอดพลาสติกที่มีฝาปิด โดยเขย่าถุงหมักก่อนเก็บตัวอย่าง เพื่อนำมาวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง สำหรับวันที่ 60 หลังการบ่มจะเก็บตัวอย่างเพิ่มเติมโดยใช้ปากคีบคีบตัวอย่างเปลือกทุเรียนหรือชานอ้อย 3 จุด คือด้านล่าง กลาง และด้านบนของถุงหมัก และนำมารวมกันเป็น 1 ตัวอย่าง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาค่าโปรตีนหยาบ (crude protein) (AOAC, 2000), น้ำหนักแห้ง (dry matter) โดยมีสูตรการคำนวณ (Bernard, 2013) ดังนี้

$$\text{น้ำหนักแห้ง (\%)} = 100 - [(\text{น้ำหนักเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักแห้ง}) \div \text{น้ำหนักเริ่มต้น}] \times 100$$

,เยื่อใยที่ไม่ละลายในสารฟอกเป็นกรด (acid detergent fiber: ADF), เยื่อใยที่ไม่ละลายในสารฟอกเป็นกลาง (neutral detergent fiber : NDF) ด้วยวิธีการของ Van Soest et al, 1991 โดยการส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์ปฏิบัติการทางการเกษตรเพื่อสุขภาพ (COE) คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี (ศูนย์รังสิต) ทำการทดลองชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ โดยมีชุดควบคุมคือ ถังหมักที่เติมน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 6 มิลลิลิตร

การวิเคราะห์ทางสถิติ

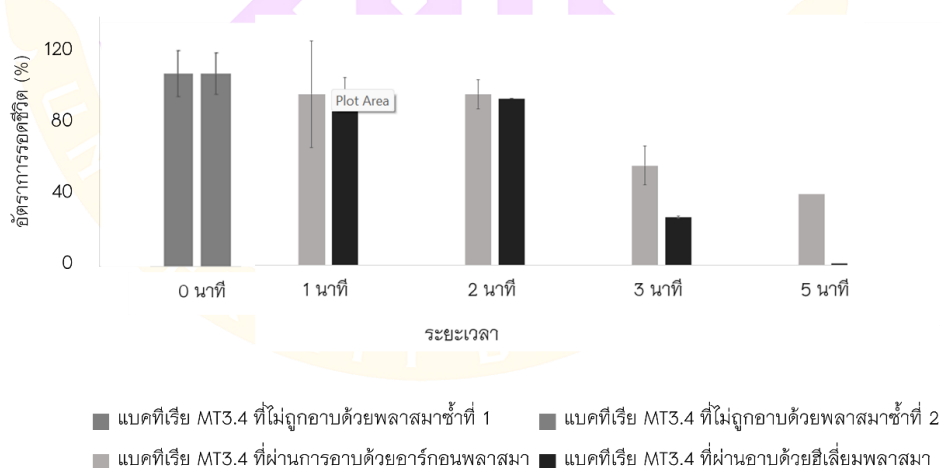
นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละการทดสอบ ผ่านโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ โดยใช้ Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล/ผลการทดลอง

อัตราการรอดชีวิตและการคัดเลือกแบคทีเรียพันธุ์กลายที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ครั้งที่ 2

แบคทีเรีย *B. subtilis* MT3.4 ที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ครั้งที่สองโดยเทคโนโลยีพลาสมาเย็น โดยแก๊สที่ใช้ในการทดลอง คือ อาร์กอนและฮีเลียมพลาสมาที่ระยะเวลาในการอาบพลาสมา คือ 1, 2, 3 และ 5 นาที พบอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ถูกอาบด้วยอาร์กอนพลาสมาสูงกว่าการอาบด้วยฮีเลียมพลาสมา โดยระยะเวลาในการอาบพลาสมาที่มากขึ้นส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตลดลงตามลำดับเมื่อเทียบกับแบคทีเรีย *B. subtilis* MT3.4 ที่ไม่ถูกอาบด้วยพลาสมา ดังแสดงในภาพ 11 และจากการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ภายหลังจากการถูกอาบด้วยพลาสมาทุกเงื่อนไข จำนวน 581 ไอโซเลท ด้วยวิธี DNS พบว่าไอโซเลท MT2-428 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลทอื่นที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสสูงกว่า *B. subtilis* MT3.4 1.5 เท่าขึ้นไป ดังตาราง 7 ทั้งนี้ไอโซเลทนี้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการอาบอาร์กอนพลาสมาเป็นเวลา 5 นาที



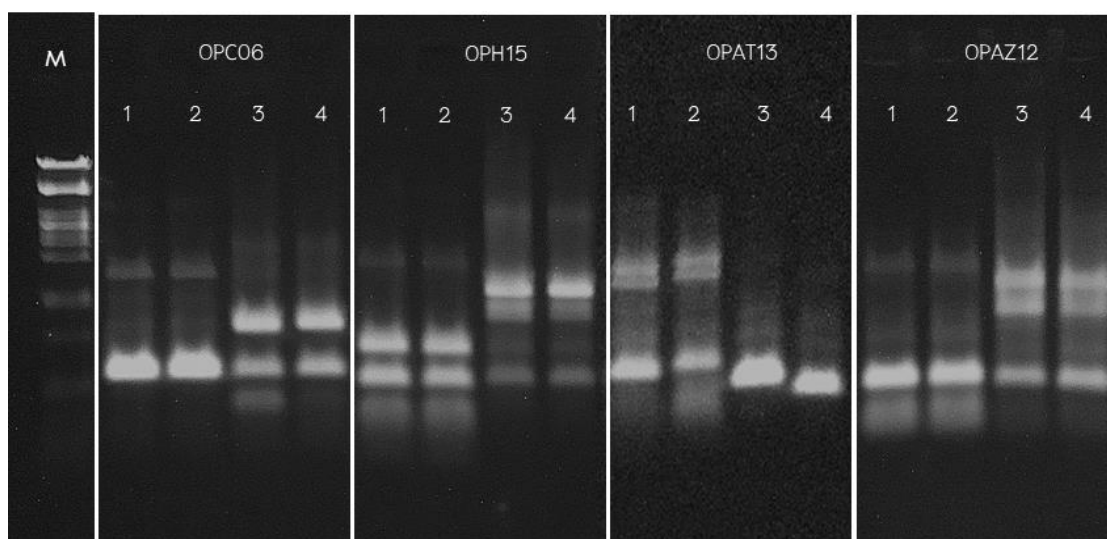
ภาพ 11 อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียพันธุ์กลายที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ครั้งที่ 2 ด้วยเทคโนโลยีพลาสมาเย็นโดยใช้อาร์กอนและฮีเลียมพลาสมา ที่ระยะเวลา 1, 2, 3 และ 5 นาที

ตาราง 7 แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลลาเนสเทียบกับแบคทีเรียชูดควบคุม (*B. subtilis* MT3.4)

ไอโซเลท	ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์
	ไลลาเนส (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)
<i>B. subtilis</i> MT3.4 (ชูดควบคุม)	32.67 ± 0.08
MT2-324	63.10 ± 0.47
MT2-388	58.17 ± 0.65
MT2-403	75.20 ± 0.75
MT2-405	76.23 ± 0.74
MT2-427	76.71 ± 0.73
MT2-428	90.27 ± 0.55
MT2-436	78.39 ± 0.73
MT2-441	76.38 ± 0.74

ผลของการวิเคราะห์ความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอด้วยเทคนิค HAT-RAPD

เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *B. subtilis* MT2-428 เปรียบเทียบกับแบคทีเรีย *B. subtilis* MT3.4 (ชูดควบคุม) ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 5 ไพรเมอร์ พบไพรเมอร์จำนวน 4 ไพรเมอร์ คือ OPC06, OPH15, OPAT13 และ OPAZ12 ที่แสดงความแตกต่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *B. subtilis* MT2-428 ดังภาพ 12 ซึ่งสามารถบ่งชี้ได้ว่าการเกิดการกลายพันธุ์ระดับดีเอ็นเอ



ภาพ 12 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์แบบคู่ 4 ไพรเมอร์ได้แก่ OPC06, OPH15, OPAT13 และ OPAZ12: เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน lambda/PstI, เลน 1 และ 2 คือ *B. subtilis* MT3.4, เลน 3 และ 4 คือ *B. subtilis* MT2-428

นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของยีนไซลันเนสจากดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *B. subtilis* MT2-428 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 87 (ภาพ 13) โดยมีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจากลิวซีน (Leucine) เป็นโพรลีน (Proline) และในตำแหน่งที่ 145 มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจากเซอรีน (Serine) เป็นทรีโอนีน (Threonine) เหมือนแบคทีเรียพันธุ์ดั้งเดิม

```

MxynA      MFKFKKNFLVGLSAALMSISLFSATASAASTDYWQNWDGGGIVNAVNGSGGNYSVNWSN 60
CxynA      MFKFKKNFLVGLSAALMSISLFSATASAASTDYWQNWDGGGIVNAVNGSGGNYSVNWSN 60
428        -----GISLFSATASAASTDYWQNWDGGGIVNAVNGSGGNYSVNWSN 43
          .*****

MxynA      TGNFVVGKGWTTGSPFRTINYNAGVWAPNGNGYLTLYGWTRSPLEIYYVVDSWGTYRPTG 120
CxynA      TGNFVVGKGWTTGSPFRTINYNAGVWAPNGNGYLTLYGWTRSPLEIYYVVDSWGTYRPTG 120
428        TGNFVVGKGWTTGSPFRTINYNAGVWAPNGNGYLTLYGWTRSPLEIYYVVDSWGTYRPTG 103
          *****

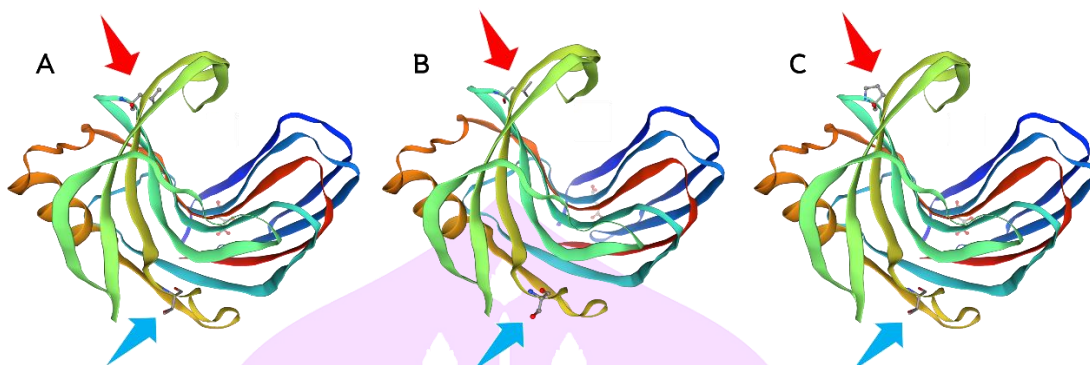
MxynA      TYKGTVKSDGGTYDIYTTTRYNAPSIDGDRITFTQYWSVRQSKRPTGSNATITFSNHVNA 180
CxynA      TYKGTVKSDGGTYDIYTTTRYNAPSIDGDRITFTQYWSVRQTKRPTGSNATITFSNHVNA 180
428        TYKGTVKSDGGTYDIYTTTRYNAPSIDGDRITFTQYWSVRQYKRPTGSNATITFSNHVNA 163
          *****

MxynA      WKSHGMNLGSNWAYQVMATEEYQSSGSSNVTWV 213
CxynA      WKSHGMNLGSNWAYQVMATEEYQSSGSSNVTWV 213
428        WKSHGMNLGSNWAYQVMATEEYQSSGSSNVTWV 196
          *****

```

ภาพ 13 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนระหว่าง *B. subtilis* พันธุ์ดั้งเดิม (CxynA), *B. subtilis* MT3.4 (MxynA) และ *B. subtilis* MT2-428 โดยตำแหน่งกรดอะมิโนไฮไลต์สีเขียวคือตำแหน่งที่มีการแทนที่ของกรดอะมิโนจาก Leu เป็น Pro และตำแหน่งกรดอะมิโนที่ไฮไลต์สีเหลืองคือตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนกลับของกรดอะมิโนจาก Ser เป็น Thr กรอบเส้นประสีแดงคือบริเวณเร่ง (active site)

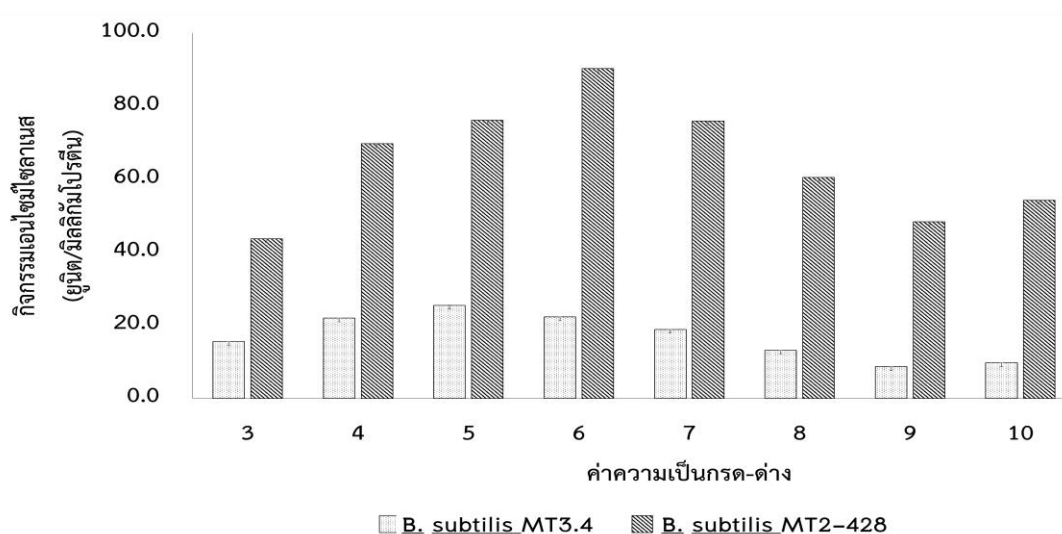
จากการนำโครงสร้างโปรตีนของยีนไซลาเนสของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์มาเปรียบเทียบโครงสร้าง 3 มิติ ด้วยโปรแกรม SWISS-MODEL ตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนลิซีน (Leu) เป็นโปรลีน (Pro) ที่ตำแหน่ง 87 อยู่ในเบต้าชีต 6 (β -sheet 6) ดังภาพ 14 และโครงสร้างโปรตีนสามมิติของยีนไซลาเนสใช้โมเดลของ 2DCY เป็นแม่แบบในการสร้าง



ภาพ 14 โครงสร้างโปรตีน 3 มิติของยีนไซลานเนส โดยภาพ A คือโครงสร้างโปรตีนของยีนไซลานเนสแบคทีเรีย *B. subtilis* พันธุ์ดั้งเดิม ภาพ B คือโครงสร้างโปรตีนของยีนไซลานเนสแบคทีเรีย *B. subtilis* MT3.4 และภาพ C คือโครงสร้างโปรตีน 3 มิติของยีนไซลานเนสแบคทีเรีย *B. subtilis* MT2-428 ตำแหน่งที่ลูกศรสีแดงชี้คือตำแหน่งที่มีการแทนที่ของกรดอะมิโนจาก ลิวซีน (Leu) เป็นโพรลีน (Pro) และตำแหน่งลูกศรสีฟ้าชี้คือตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีการเปลี่ยนกลับจากเซอรีน (Ser) เป็นทรีโอนีน (Thr)

ผลของความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสจาก *B. subtilis* MT2-428 เปรียบเทียบกับ *B. subtilis* MT3.4

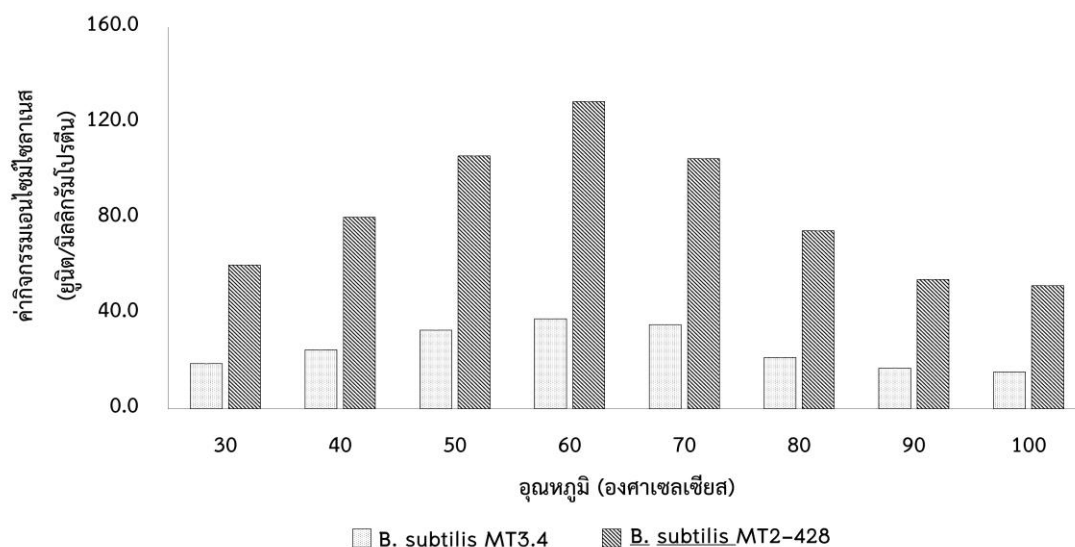
จากการทดลองเอนไซม์หยาบผสมกับ 1% Beechwood Xylan ที่ละลายในบัฟเฟอร์ pH ตั้งแต่ 3-10 พบว่ามีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสของแบคทีเรีย *B. subtilis* MT3.4 และ *B. subtilis* MT2-428 สูงสุดที่ pH 5 และ pH 6 ตามลำดับ (25.51 ± 0.03 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน, 90.34 ± 0.03 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน) ดังภาพ 15



ภาพ 15 กิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสในสภาวะความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ 3.0–10.0 ของ *B. subtilis* MT3.4 (กรอบลายจุด) และ *B. subtilis* MT2-428 (กรอบลายเส้นทแยง) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95

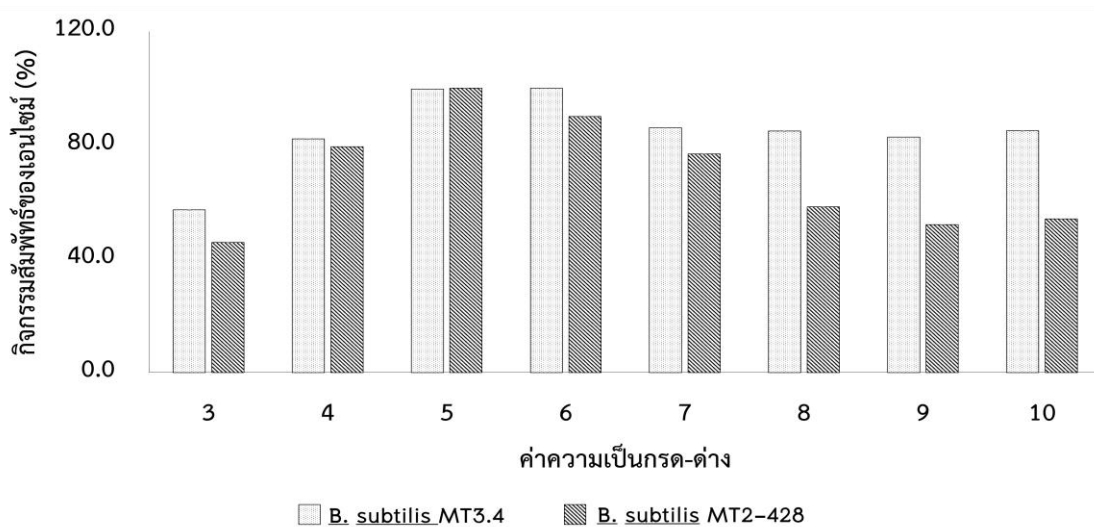
ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสจาก *B. subtilis* MT2-428 เปรียบเทียบกับ *B. subtilis* MT3.4

จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไซลานเนสพบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* MT3.4 และ *B. subtilis* MT2-428 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 37.751 ± 0.045 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน และ 128.777 ± 0.020 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึง 100 องศาเซลเซียส พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสลดลง 2.4 เท่า (ดังภาพ 16)

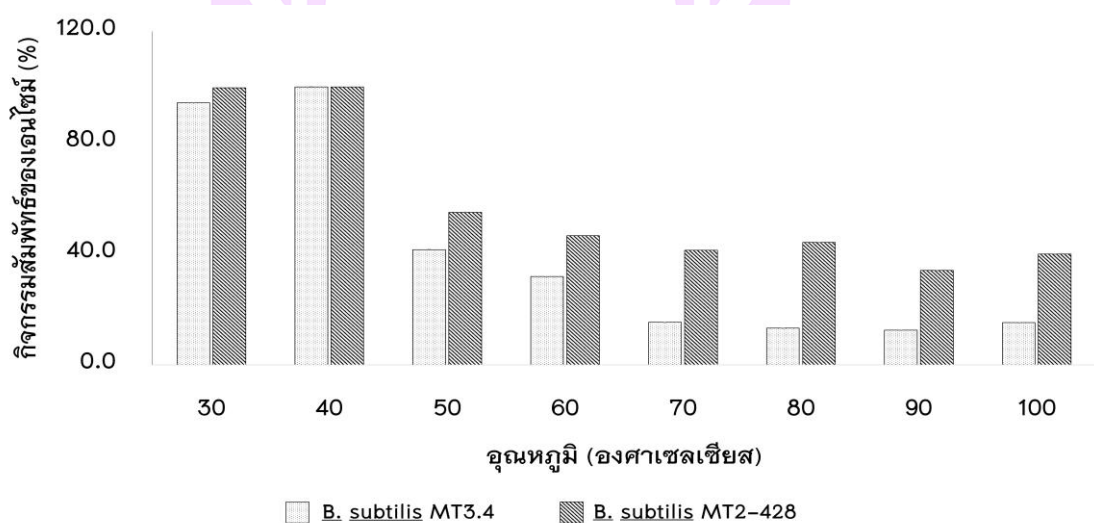


ภาพ 16 กิจกรรมเอนไซม์ไฮโดรไลสในสภาวะอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ 30–100 องศาเซลเซียส ของ *B. subtilis* MT3.4 (กรอกลายจุด) และ *B. subtilis* MT2-428 (กรอกลายเส้นทแยง) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95

จากการทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ไฮโดรไลสต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง ตั้งแต่ 3.0-10.0 พบว่า ความเสถียรของเอนไซม์อยู่ในช่วงที่ความเป็นกรด-ด่างที่ 5.0–6.0 ซึ่งสามารถหาค่าได้ในสภาวะที่เป็นกรด แสดงดังภาพ 17 และจากผลการทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ไฮโดรไลสต่ออุณหภูมิตั้งแต่ 30-100 องศาเซลเซียส พบความเสถียรของเอนไซม์ไฮโดรไลสต่ออุณหภูมิอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส โดยค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ได้จากการเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมเอนไซม์ไฮโดรไลสสูงที่สุด ณ ความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมินั้น ๆ แสดงดังภาพ 18



ภาพ 17 ความเสถียรของเอนไซม์ไลลาเนสของ *B. subtilis* MT3.4 และ *B. subtilis* MT2-428 ภายใต้สภาวะความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกันตั้งแต่ 3-10 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95

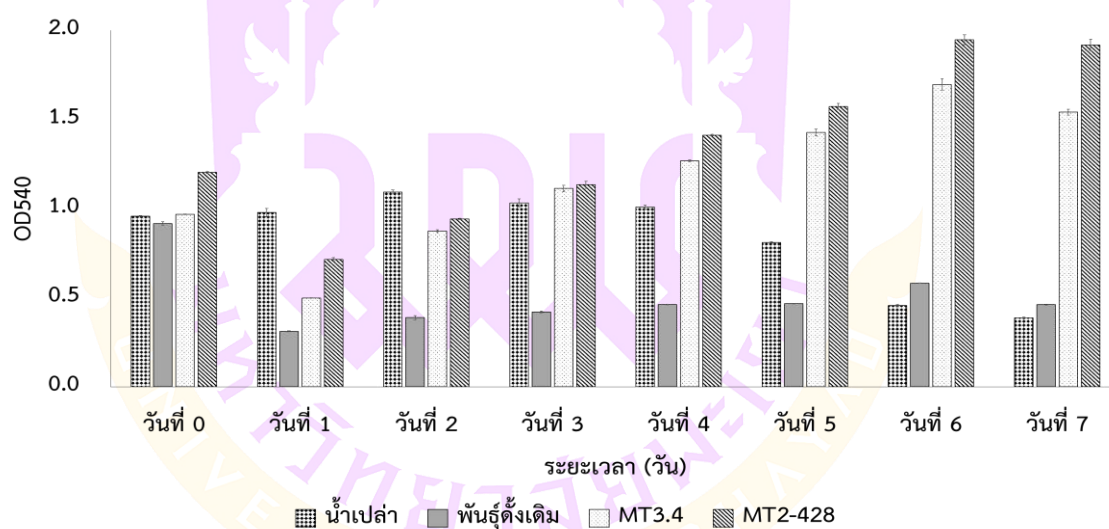


ภาพ 18 ความเสถียรของเอนไซม์ไลลาเนสของ *B. subtilis* MT3.4 และ *B. subtilis* MT2-428 ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกันตั้งแต่ 30-100 องศาเซลเซียส ที่ระดับความเชื่อมั่น 95

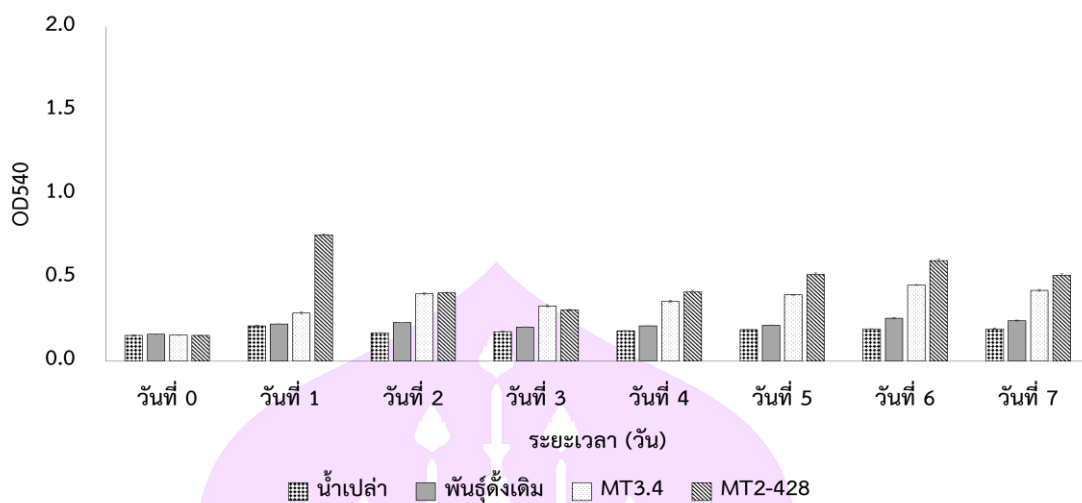
ผลการทดสอบการย่อยวัตถุดิบแต่ละชนิดด้วยแบคทีเรีย

จากการทดสอบความสามารถการย่อยวัตถุดิบทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ เปลือกทุเรียน, ชานอ้อย และเปลือกข้าวโพด นั้นพบว่าแบคทีเรียพันธุ์กลาย *B. subtilis* MT2-428 มีความสามารถในการย่อยได้สูงกว่า *B. subtilis* และ *B. subtilis* MT3.4

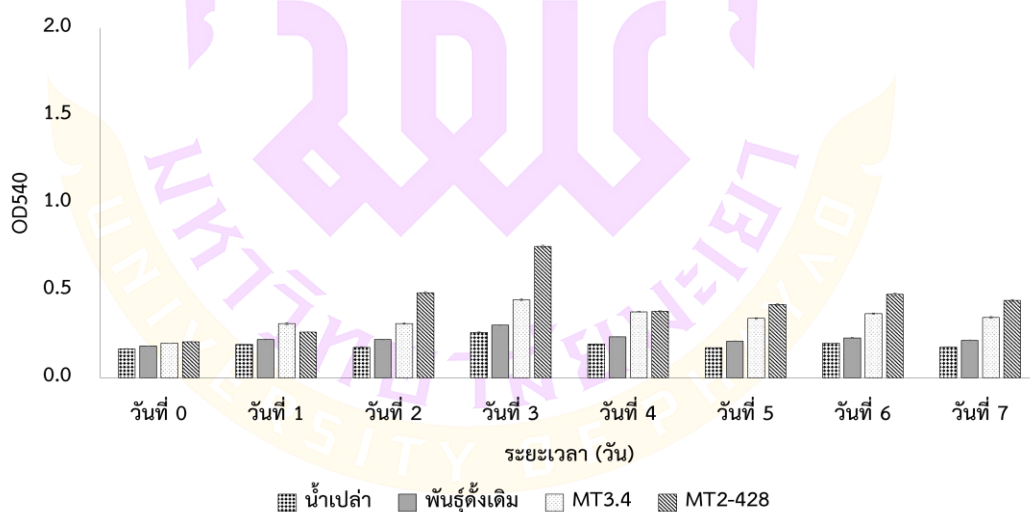
โดยชุดทดสอบที่ใช้เปลือกทุเรียนเป็นวัตถุดิบจะมีการปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดและแปรผันตรงกับระยะเวลาการหมักที่นานขึ้นดังภาพ 19 ในขณะที่ชุดทดสอบที่ใช้ชานอ้อยเป็นวัตถุดิบพบค่าการปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดในวันที่ 1 จากนั้นลดลงและเพิ่มสูงขึ้นใหม่อีกครั้งในวันที่ 5-7 ดังภาพ 20 สำหรับการใช้เปลือกข้าวโพดเป็นวัตถุดิบพบการปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดในวันที่ 3 ของการหมักและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงที่ในวันที่ 5-7 ดังภาพ 21 จากผลการทดสอบพบว่า *B. subtilis* MT3.4 มีความสามารถในการย่อยวัตถุดิบได้ดีเป็นลำดับที่ 2 และ *B. subtilis* ย่อยวัตถุดิบชานอ้อยและเปลือกข้าวโพดได้ดีกว่าการหมักด้วยน้ำเปล่า (ภาพ 19–21)



ภาพ 19 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกปลดปล่อยจากการทดสอบการย่อยเปลือกทุเรียน โดย กรอบลายข้าวหลามตัด คือ เปลือกทุเรียนที่หมักด้วยน้ำเปล่า, กรอบสี่เหลี่ยม คือ เปลือกทุเรียนที่หมักด้วยแบคทีเรีย *B. subtilis* พันธุ์ดั้งเดิม, กรอบลายจุด คือ เปลือกทุเรียนที่หมักด้วยแบคทีเรีย *B. subtilis* MT3.4 และ กรอบลายเส้นแนวทแยง คือ เปลือกทุเรียนที่หมักด้วยแบคทีเรีย *B. subtilis* MT2-428

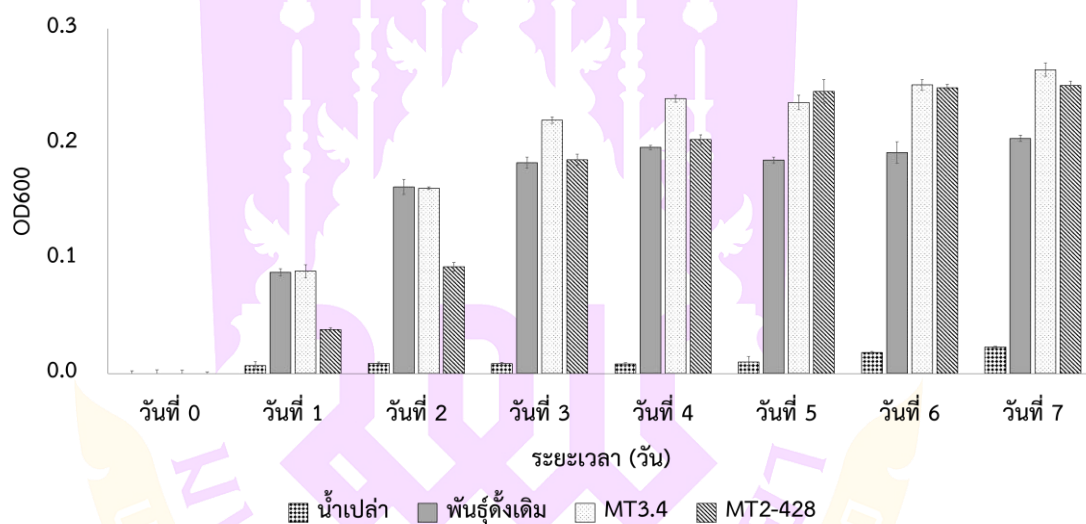


ภาพ 20 กราฟแสดงการย่อยวัตถุติดของแบคทีเรียในชานอ้อย โดย กรอบลายข้าวหลามตัด คือ ชานอ้อยที่หมักด้วยน้ำเปล่า, กรอบสี่เหลี่ยม คือ ชานอ้อยที่หมักด้วยแบคทีเรีย *B. subtilis* พันธุ์ดั้งเดิม, กรอบลายจุด คือ ชานอ้อยที่หมักด้วยแบคทีเรีย *B. subtilis* MT3.4 และ กรอบลายเส้นแนวทแยง คือ ชานอ้อยที่หมักด้วยแบคทีเรีย *B. subtilis* MT2-428

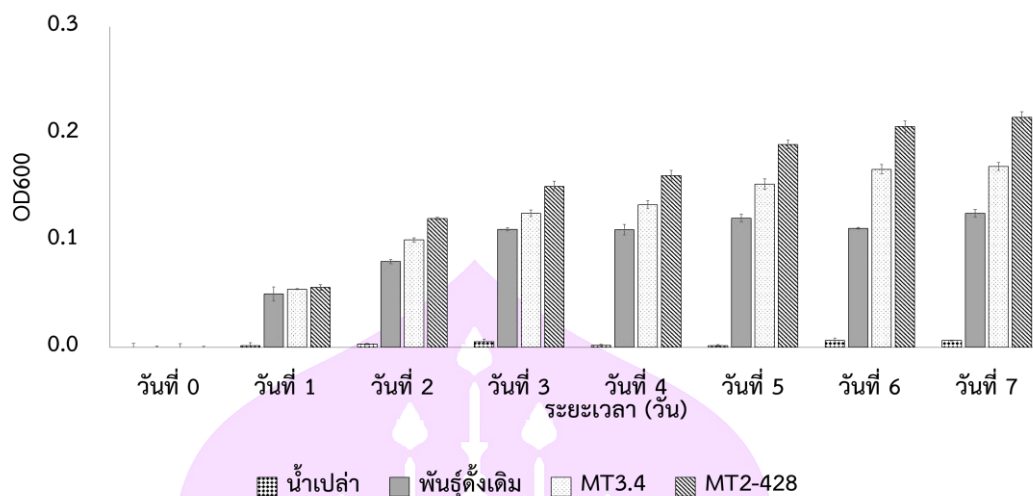


ภาพ 21 กราฟแสดงการย่อยวัตถุติดของแบคทีเรียในเปลือกข้าวโพด โดยกรอบลายข้าวหลามตัด คือ เปลือกข้าวโพดที่หมักด้วยน้ำเปล่า, กรอบสี่เหลี่ยม คือ เปลือกข้าวโพดที่หมักด้วยแบคทีเรีย *B. subtilis* พันธุ์ดั้งเดิม, กรอบลายจุด คือ เปลือกข้าวโพดที่หมักด้วยแบคทีเรีย *B. subtilis* MT3.4 และ กรอบลายเส้นแนวทแยง คือ เปลือกข้าวโพดที่หมักด้วยแบคทีเรีย *B. subtilis* MT2-428

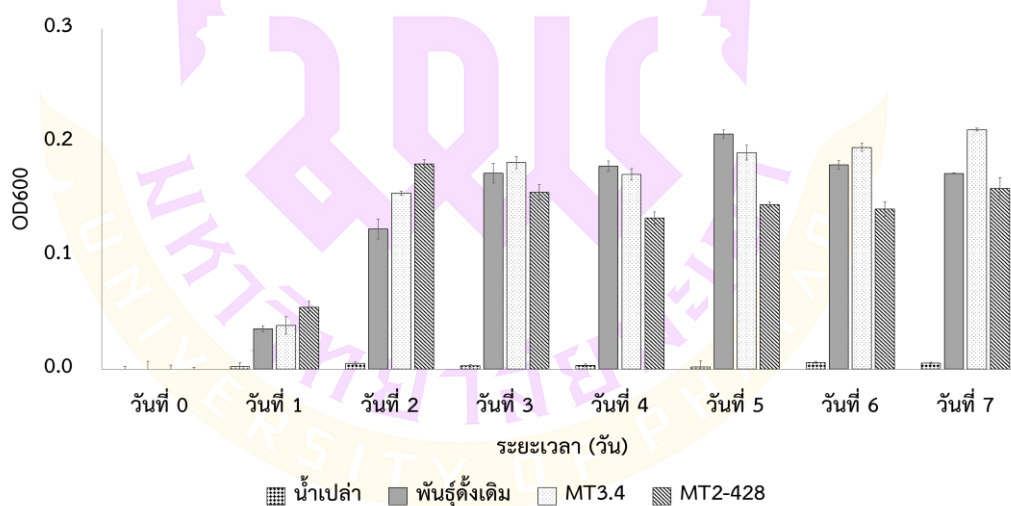
ผลการวัดการเจริญของแบคทีเรียโดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD600) ในการทดสอบการย่อยวัตถุดิบต่าง ๆ ของแบคทีเรีย พบว่าการหมักวัตถุดิบทั้ง 3 ชนิดด้วยน้ำเปล่ามีการเจริญของแบคทีเรียเล็กน้อย ส่วนการหมักวัตถุดิบด้วยแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ พบการเจริญที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในชุดทดสอบที่ใช้เปลือกทุเรียนและชานอ้อยเป็นวัตถุดิบ ในขณะที่ชุดทดสอบที่ใช้เปลือกข้าวโพดเป็นวัตถุดิบพบการเจริญของ *B. subtilis* สูงสุดในวันที่ 3-6, *B. subtilis* MT3.4 เจริญสูงสุดในวันที่ 5-7 และ *B. subtilis* MT2-428 เจริญสูงสุดในวันที่ 2 ดังภาพ 22-24



ภาพ 22 กราฟแสดงการเจริญของแบคทีเรียในชุดการทดสอบย่อยเปลือกทุเรียน โดยกรอบลายข้าวหลามตัด คือ เปลือกทุเรียนที่หมักด้วยน้ำเปล่า, กรอบสี่เหลี่ยม คือ เปลือกทุเรียนที่หมักด้วยแบคทีเรีย *B. subtilis* พันธุ์ดั้งเดิม, กรอบลายจุด คือ เปลือกทุเรียนที่หมักด้วยแบคทีเรีย *B. subtilis* MT3.4 และ กรอบลายเส้นแนวทแยง คือ เปลือกทุเรียนที่หมักด้วยแบคทีเรีย *B. subtilis* MT2-428



ภาพ 23 กราฟแสดงการเจริญของแบคทีเรียในชุดการทดสอบย่อยชานอ้อย โดยกรอบลายข้าวหลามตัด คือ ชานอ้อยที่หมักด้วยน้ำเปล่า, กรอบสี่เหลี่ยม คือ ชานอ้อยที่หมักด้วยแบคทีเรีย *B. subtilis* พันธุ์ดั้งเดิม, กรอบลายจุด คือ ชานอ้อยที่หมักด้วยแบคทีเรีย *B. subtilis* MT3.4 และ กรอบลายเส้นแนวทแยง คือ ชานอ้อยที่หมักด้วยแบคทีเรีย *B. subtilis* MT2-428



ภาพ 24 กราฟแสดงการเจริญของแบคทีเรียในชุดการทดสอบย่อยเปลือกข้าวโพด โดยกรอบลายข้าวหลามตัด คือ เปลือกข้าวโพดที่หมักด้วยน้ำเปล่า, กรอบสี่เหลี่ยม คือ เปลือกข้าวโพดที่หมักด้วยแบคทีเรีย *B. subtilis* พันธุ์ดั้งเดิม, กรอบลายจุด คือ เปลือกข้าวโพดที่หมักด้วยแบคทีเรีย *B. subtilis* MT3.4 และ กรอบลายเส้นแนวทแยง คือ เปลือกข้าวโพดที่หมักด้วยแบคทีเรีย *B. subtilis* MT2-428

ผลการผลิตอาหารสัตว์หมักจากเปลือกทุเรียน ขานอ้อย และเปลือกข้าวโพดด้วยแบคทีเรีย *B. subtilis* MT2-428

จากการนำแบคทีเรีย *B. subtilis* MT2-428 มาหมักกับเปลือกทุเรียน ขานอ้อย และเปลือกข้าวโพด เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (หมักด้วยน้ำเปล่า) และแบคทีเรีย *B. subtilis* MT3.4 (ตาราง 8) เป็นเวลา 60 วัน จากนั้นส่งอาหารสัตว์หมักที่ได้ไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนา พบว่าอาหารสัตว์หมักมีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) อยู่ในช่วง 3.79-4.34 อาหารสัตว์หมักจากเปลือกข้าวโพดจะมีค่าวัตถุแห้งสูงที่สุด (ร้อยละ 48.01-52.60) รองลงมาคืออาหารสัตว์หมักจากขานอ้อยโดยมีค่าวัตถุแห้งเท่ากับร้อยละ 20.0-21.0 และอาหารสัตว์หมักจากเปลือกทุเรียนจะมีค่าวัตถุแห้งต่ำที่สุด (ร้อยละ 13.81-13.99) ในส่วนของค่าพลังงานอาหารสัตว์หมักจากขานอ้อยให้ค่าพลังงานสูงที่สุด (4.32-4.38 กิโลแคลอรี/กรัม) รองลงมาคืออาหารสัตว์หมักจากเปลือกข้าวโพดให้ค่าพลังงานในช่วง 4.05-4.11 กิโลแคลอรี/กรัม และอาหารสัตว์หมักจากเปลือกทุเรียนให้ค่าพลังงานต่ำที่สุด (3.69-3.74 กิโลแคลอรี/กรัม)

นอกจากนี้พบว่าอาหารสัตว์หมักจากเปลือกทุเรียนมีปริมาณโปรตีนสูงที่สุด เท่ากับร้อยละ 6.94-7.73 และอาหารสัตว์หมักจากขานอ้อยมีปริมาณโปรตีนต่ำที่สุด เท่ากับร้อยละ 2.22-2.89 ทั้งนี้ค่าเยื่อใยที่ไม่ละลายในสารละลายที่เป็นกลาง: NDF (neutral detergent fiber) พบว่าอาหารหมักจากขานอ้อยและเปลือกทุเรียนให้ค่าไม่แตกต่างกัน อยู่ในช่วงร้อยละ 71.01-85.22 สำหรับอาหารสัตว์หมักจากเปลือกทุเรียนหมักพบค่า NDF ต่ำกว่าอาหารหมัก 2 ชนิดแรก โดยมีค่า NDF ร้อยละ 56.45-58.90 และจากการตรวจวิเคราะห์ค่าเยื่อใยที่ไม่ละลายในสารละลายที่เป็นกรด: ADF (acid detergent fiber) พบว่าอาหารสัตว์หมักจากขานอ้อยมีค่าสูงที่สุด ร้อยละ 53.58-57.47 ในขณะที่อาหารสัตว์หมักจากเปลือกทุเรียนและเปลือกข้าวโพดมีค่าไม่ต่างกัน อยู่ในช่วงร้อยละ 41.0-45.03 ดังแสดงในตารางที่ 8

ตาราง 8 โภชนะอาหารสัตว์หมักจาก เปลือกทุเรียน ขานอ้อย และเปลือกข้าวโพด เป็นเวลา 60 วัน

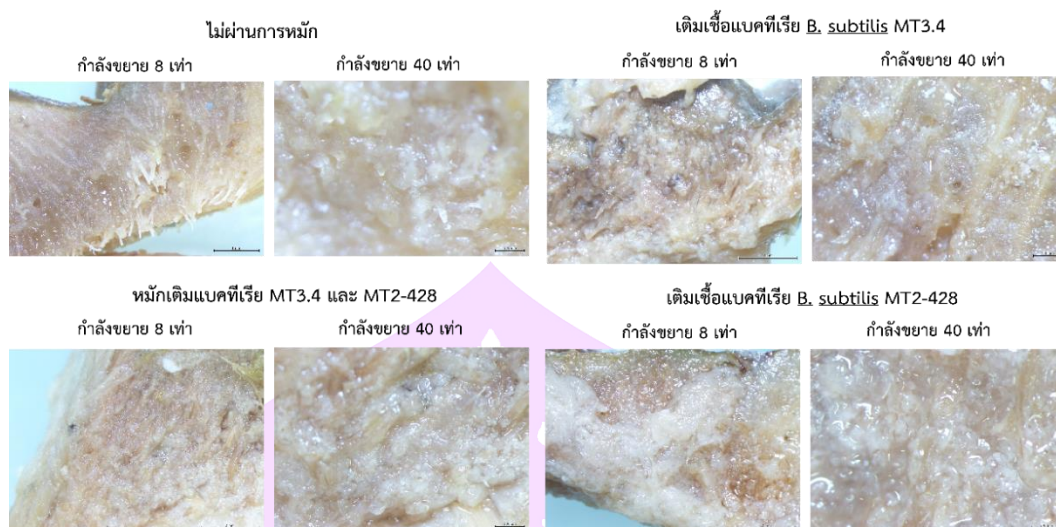
วัตถุดิบ	pH	DM (%)	Energy (Kcal/g)	CP (%)	NDF (%)	ADF (%)
เปลือกทุเรียนไม่เต็มเชื้อ						
MT3.4 และ MT2-428 (ชุดควบคุม)	3.84	13.81	3.743	6.94	56.45	41.16
เปลือกทุเรียนเต็มเชื้อ						
<u>B. subtilis</u> MT3.4	3.83	13.92	3.686	7.73	58.90	41.88
เปลือกทุเรียนเต็มเชื้อ						
<u>B. subtilis</u> MT2-428	3.79	13.99	3.685	7.33	56.64	41.27
ขานอ้อยไม่เต็มเชื้อ						
MT3.4 และ MT2-428 (ชุดควบคุม)	3.80	20.00	4.327	2.89	80.74	55.47
ขานอ้อยเต็มเชื้อ						
แบคทีเรีย	4.00	21.00	4.323	2.22	79.22	53.58
<u>B. subtilis</u> MT3.4						
ขานอ้อยเต็มเชื้อ						
แบคทีเรีย	4.34	21.00	4.377	2.35	85.22	57.47
<u>B. subtilis</u> MT2-428						

ตาราง 8 (ต่อ)

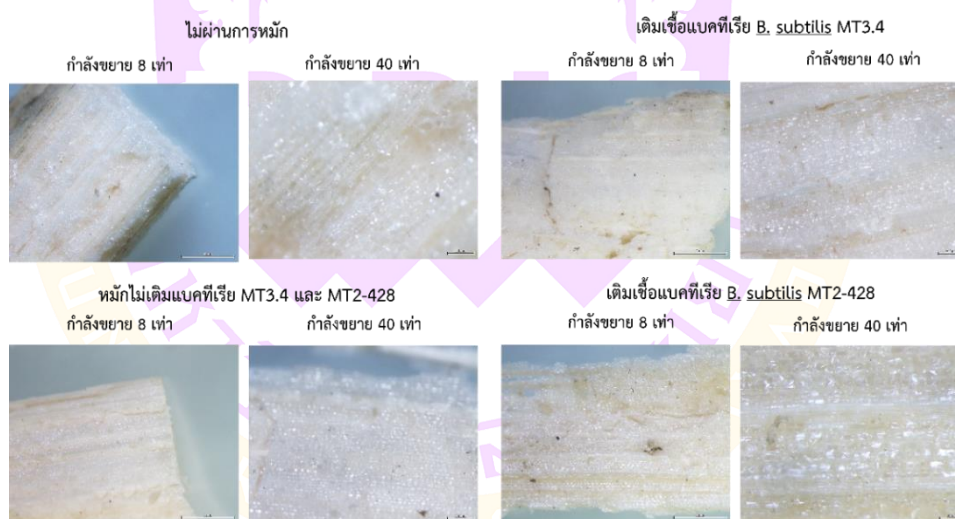
วัตถุดิบ	pH	DM (%)	Energy (Kcal/g)	CP (%)	NDF (%)	ADF (%)
เปลือกข้าวโพดไม่เต็มเชื้อ						
MT3.4 และ MT2-428 (ชุดควบคุม)	4.18	48.01	4.047	4.98	80.10	45.03
เปลือกข้าวโพดเต็มเชื้อ						
<i>B. subtilis</i> MT3.4	4.28	52.60	4.114	7.59	76.05	41.36
เปลือกข้าวโพดเต็มเชื้อ						
<i>B. subtilis</i> MT2-428	4.08	51.95	4.098	2.26	71.01	41.00

ผลการตรวจสอบลักษณะของอาหารสัตว์หมักภายใต้กล้องจุลทรรศน์

จากการทดสอบผลิตอาหารสัตว์หมักจากเปลือกทุเรียน ชานอ้อย และเปลือกข้าวโพดด้วยการหมักเงื่อนไขต่างๆ เป็นเวลา 60 วัน ได้นำชิ้นส่วนตัวอย่างวัตถุดิบอาหารสัตว์หมักแต่ละวัตถุดิบมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอที่กำลังขยาย 8 เท่าและ 40 เท่า พบว่าในชิ้นส่วนของเปลือกทุเรียนที่หมักแบบไม่เต็มเชื้อ *B. subtilis* MT3.4 หรือ *B. subtilis* MT2-428 มีความเปื่อยยุ่ยเล็กน้อยเมื่อเทียบกับเปลือกทุเรียนที่ไม่ผ่านการหมัก ส่วนเปลือกทุเรียนที่หมักด้วยแบคทีเรีย *B. subtilis* MT3.4 และแบคทีเรีย *B. subtilis* MT2-428 พบความเปื่อยยุ่ยของบริเวณเปลือกทุเรียนชั้นใน และเปลือกทุเรียนที่หมัก *B. subtilis* MT2-428 พบการเจริญของแบคทีเรียชัดเจนกว่า 2 เงื่อนไขแรก โดยพบลักษณะเมือกที่เกิดจากแบคทีเรียบริเวณชิ้นส่วนของเปลือกทุเรียนมากกว่า 2 เงื่อนไขแรก ดังภาพ 25 สำหรับลักษณะของชิ้นส่วนอาหารสัตว์จากชานอ้อยและเปลือกข้าวโพดไม่พบความแตกต่างในแต่ละเงื่อนไขของการหมัก (ภาพ 26 และ 27)



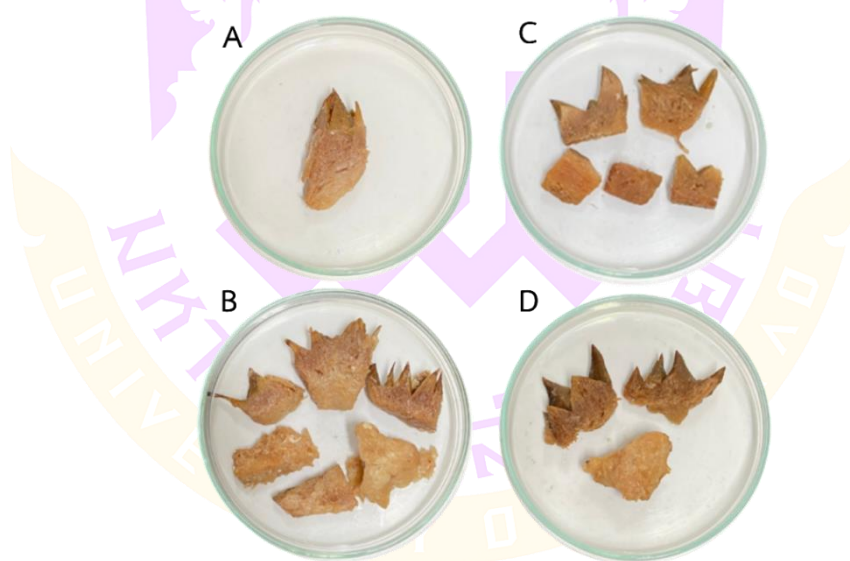
ภาพ 25 ภาพเปรียบเทียบชิ้นส่วนตัวอย่างอาหารสัตว์หมักจากเปลือกทุเรียนเป็นเวลา 60 วัน
ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope) ที่กำลังขยาย 8 เท่าและ 40 เท่า



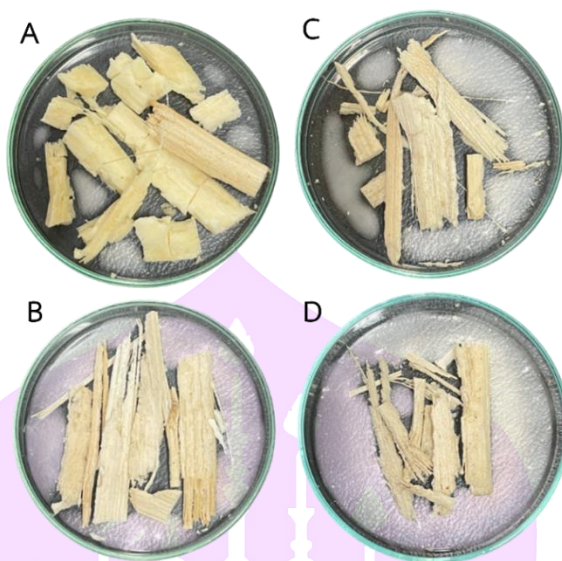
ภาพ 26 ภาพเปรียบเทียบชิ้นส่วนตัวอย่างอาหารสัตว์หมักจากขาน้อยเป็นเวลา 60 วัน
ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope) ที่กำลังขยาย 8 เท่าและ 40 เท่า



ภาพ 27 ภาพเปรียบเทียบชิ้นส่วนตัวอย่างอาหารสัตว์หมักจากเปลือกข้าวโพดเป็นเวลา 60 วัน ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope) ที่กำลังขยาย 8 เท่าและ 40 เท่า



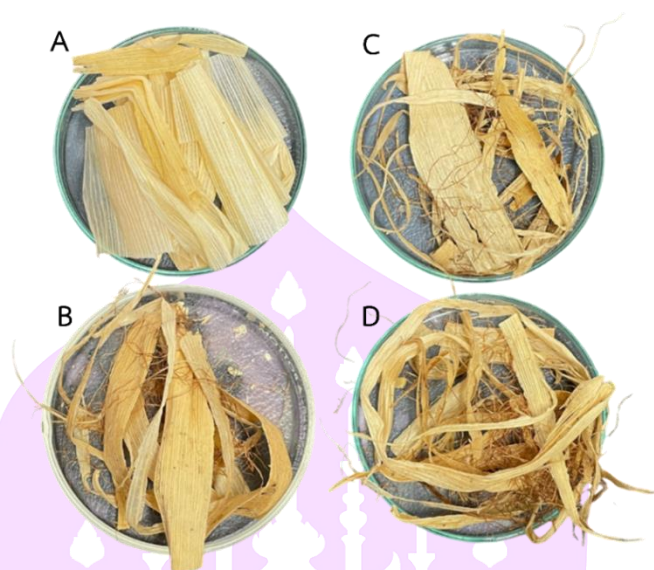
ภาพ 28 ภาพตัวอย่างอาหารสัตว์หมักเป็นเวลา 60 วันโดยมีเปลือกทุเรียนเป็นวัตถุดิบ โดย A คือเปลือกทุเรียนที่ไม่ผ่านการหมัก B คือเปลือกทุเรียนหมักโดยไม่เติมเชื้อกลุ่มผลิตไซลาลเนส (ชุดควบคุม) C คือเปลือกทุเรียนที่เติมเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* MT3.4 และ D คือเปลือกทุเรียนที่เติมเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* MT2-428



ภาพ 29 ภาพตัวอย่างอาหารสัตว์หมักเป็นเวลา 60 วันโดยมีขานอ้อยเป็นวัตถุดิบ โดย A คือขานอ้อยที่ไม่ผ่านการหมัก B คือขานอ้อยหมักโดยไม่เติมเชื้อแบคทีเรียกลุ่มผลิตไซลาลเนส (ชุดควบคุม)

C คือขานอ้อยที่เติมเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* MT3.4 และ D คือขานอ้อยที่เติมเชื้อแบคทีเรีย

B. subtilis MT2-428



ภาพ 30 ภาพตัวอย่างอาหารสัตว์หมักเป็นเวลา 60 วันโดยมีเปลือกข้าวโพดเป็นวัตถุดิบ โดย A คือเปลือกข้าวโพดที่ไม่ผ่านการหมัก B คือเปลือกข้าวโพดหมักโดยไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียผลิตไฮลาลเนส (ชุดควบคุม) C คือเปลือกข้าวโพดที่เติมเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* MT3.4 และ D คือเปลือกข้าวโพดที่เติมเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* MT2-428

บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

จากการเพิ่มประสิทธิภาพกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสจากแบคทีเรียพันธุ์กลาย *B. subtilis* MT3.4 โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ครั้งที่ 2 ด้วยเทคโนโลยีพลาสมาเย็น โดยใช้แก๊สอาร์กอน และฮีเลียมในการกำเนิดพลาสมา และระยะเวลาในการอาบพลาสมา 1-5 นาที พบไอโซเลท MT2-428 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลานเนสสูงขึ้น 3.5 เท่าเมื่อเทียบกับ *B. subtilis* MT3.4 เมื่อนำแบคทีเรีย *B. subtilis* MT2-428 มาตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเอด้วยเทคนิค High annealing temperature-random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD) โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มจำนวน 5 ไพรเมอร์ พบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* MT2-428 มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างจาก *B. subtilis* MT3.4 และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของยีนไซลานเนสจากแบคทีเรีย *B. subtilis* MT2-428 มาเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์ดั้งเดิม *B. subtilis* และแบคทีเรีย *B. subtilis* MT3.4 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 87 โดยเปลี่ยนจากลิวซีน (Leu) เป็นโพรลีน (Pro) และจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสจากแบคทีเรีย *B. subtilis* MT2-428 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และผลจากการทดสอบการย่อยวัตถุดิบ 3 ชนิด ได้แก่ เปลือกทุเรียน ชานอ้อยและเปลือกข้าวโพด เป็นเวลา 7 วัน พบว่า *B. subtilis* MT2-428 มีความสามารถในการย่อยวัตถุดิบทั้ง 3 ชนิดสูงที่สุด และผลจากการทดสอบผลิตอาหารสัตว์หมักจากวัตถุดิบ 3 ชนิด (เปลือกทุเรียน ชานอ้อย และเปลือกข้าวโพด) เป็นเวลา 60 วัน พบว่าอาหารสัตว์หมักด้วย *B. subtilis* MT3.4 หรือ *B. subtilis* MT2-428 ให้ค่าทางโภชนาการไม่ต่างกัน

อภิปรายผลการวิจัย

จากการชักนำแบคทีเรียพันธุ์กลาย *B. subtilis* MT3.4 ให้เกิดการกลายพันธุ์ครั้งที่ 2 ด้วยเทคนิคพลาสมาเย็น พบว่าอัตราการรอดชีวิตที่อาร์กอนพลาสมามีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าฮีเลียม

พลาสมา เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างจากกราฟอัตราการรอดชีวิต (ภาพ 11) แบคทีเรียที่อาบด้วยอีเลียมพลาสมามีอัตราการรอดชีวิตต่ำเนื่องจากคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของก๊าซทั้ง 2 ชนิดที่มีค่าพลังงานไอออไนเซชันและน้ำหนักโมเลกุลที่ต่างกัน อาจส่งผลให้การแตกตัวของก๊าซเมื่อได้รับพลังงานไฟฟ้าสูง ทำให้ก๊าซอีเลียมที่มีค่าพลังงานสูงมีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าอาร์กอนจึงมีอำนาจในการทะลุทะลวงผ่านผนังเซลล์แบคทีเรียได้ดีกว่า (Polşa et al, 2020) และผลของงานวิจัยนี้สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Chandana et al, 2018 ซึ่งรายงานว่าเมื่อแบคทีเรียมีการอาบพลาสมาในระยะเวลานาน ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์แบคทีเรียต่ำกว่าการอาบพลาสมาในระยะเวลานั้น

หลังจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ครั้งที่ 2 และคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ไลลาเนส และพบว่าภายใต้เงื่อนไขอาร์กอนพลาสมาที่ 2 นาที แบคทีเรียโอโซเลท MT2-428 ที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลลาเนสสูงที่สุด จากนั้นนำมาตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนโดยเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไลลาเนสที่ได้จากแบคทีเรียพันธุ์ดั้งเดิม *B. subtilis*, แบคทีเรีย *B. subtilis* MT3.4 และแบคทีเรีย *B. subtilis* MT2-428 พบว่าเกิดการแทนที่ของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 87 จากลิวซีน (Leu) เป็นกรดอะมิโนในกลุ่มไฮโดรโฟบิก (hydrophobic group) เป็นโพรลีน (Pro) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนในกลุ่มพิเศษ (special group) ในตำแหน่งที่บริเวณ β -sheet 6 (ภาพ 13) ซึ่งใกล้กับบริเวณเร่ง (active site) อาจส่งผลให้เซลล์แบคทีเรียมีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 3.5 เท่าเมื่อเทียบกับแบคทีเรียพันธุ์กลาย *B. subtilis* MT3.4

จากการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ไลลาเนสจากแบคทีเรียพันธุ์กลาย *B. subtilis* MT3.4 และ *B. subtilis* MT2-428 พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลลาเนสของ *B. subtilis* MT3.4 เท่ากับ 5.0 ในขณะที่ *B. subtilis* MT3.4 จะพบค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลลาเนสสูงที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.0 โดยพบกิจกรรมของเอนไซม์ เท่ากับ 25.51 ± 0.03 และ 90.34 ± 0.03 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kalawong et al, 2018 ที่รายงานว่าสภาวะที่เหมาะสมของค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลลาเนสของแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* CX1 และ *B. subtilis* B4 คือ pH 6.0 และมีรายงานวิจัยของ Joshi et al, 2022 รายงานว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ VDB5 และ *B. licheniformis* สายพันธุ์ KBFB4 มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ในสภาวะการทำอาหารสัตว์หมัก เมื่อหมักเป็นเวลานาน วัตถุดิบจะแปรสภาพเป็นกรดมากยิ่งขึ้น แบคทีเรียจึงต้องมีความทนต่อความเป็นกรดในระดับดี ดังนั้นแบคทีเรียพันธุ์กลายจึงสามารถย่อยวัตถุดิบในอาหารสัตว์ได้ถึงแม้สภาวะความเป็นกรดจะมากขึ้น

การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลลาเนสพบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* MT3.4 และแบคทีเรีย *B. subtilis* MT2-428 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลลาเนสสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ เท่ากับ 37.751 ± 0.045 และ 128.777 ± 0.020 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึง 100 องศาเซลเซียส พบว่าค่าการทำงานของเอนไซม์ไลลาเนสลดลง 2.4 เท่า ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Polsa et al, 2020 ที่รายงานว่า *B. subtilis* พันธุ์กลาย พบสภาวะที่เหมาะสมของกิจกรรมของเอนไซม์ไลลาเนสที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และงานวิจัยของ Suri et al, 2020 พบสภาวะที่เหมาะสมต่ออุณหภูมิมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลลาเนส ของ *Bacillus* sp. XPB-11 พันธุ์กลายสูงสุดที่ 60 องศาเซลเซียส เนื่องจากการทำอาหารสัตว์หมักในสภาพแวดล้อมทั่วไปมีอุณหภูมิโดยเฉลี่ยที่ 30 องศาเซลเซียส และแบคทีเรีย *B. subtilis* MT2-428 มีคุณสมบัติทนต่ออุณหภูมิสูงได้ จึงเหมาะสำหรับการใช้ในกระบวนการทำอาหารสัตว์หมักทั่วไป

จากการศึกษาการย่อยวัตถุดิบของแบคทีเรีย *B. subtilis* MT2-428 ด้วยเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรได้แก่ เปลือกทุเรียน ชานอ้อย และเปลือกข้าวโพด โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (น้ำเปล่า) แบคทีเรีย *B. subtilis* พันธุ์ดั้งเดิม และแบคทีเรีย *B. subtilis* MT3.4 พบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* MT2-428 มีความสามารถในการย่อยวัตถุดิบสูงที่สุด โดยพบการปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดในการหมักวัตถุดิบทั้ง 3 ชนิด ทั้งนี้แบคทีเรียมีการผลิตเอนไซม์ไลลาเนสที่สามารถย่อยเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสในผนังเซลล์พืช โดยส่วนประกอบของผนังเซลล์พืชในแต่ละวัตถุดิบมีเซลลูโลสประมาณร้อยละ 40-60, เฮมิเซลลูโลสประมาณร้อยละ 20-40 และลิกนินประมาณร้อยละ 10-20 ผลจากการทดลองพบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* MT2-428 สามารถย่อยเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเหล่านี้ได้ดีจึงสามารถปลดปล่อยน้ำตาลออกมาได้สูงที่สุด

และจากการทดลองทำอาหารสัตว์หมักจากเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรทั้ง 3 ชนิดเป็นเวลา 60 วัน โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่เติม *B. subtilis* MT3.4 หรือ *B. subtilis* MT2-428), เติมแบคทีเรีย *B. subtilis* MT3.4 และเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* MT2-428 พบว่าคุณค่าโภชนะที่ได้ในอาหารแต่ละวัตถุดิบจะแตกต่างกัน แต่การหมักด้วยเงื่อนไขที่ต่างกันให้ผลไม่ต่างกัน โดยค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารสัตว์อยู่ในช่วง 3-4 ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสมของอาหารสัตว์หมัก สำหรับจุดเด่นของอาหารสัตว์หมักจากเปลือกทุเรียนจะมีค่าปริมาณโปรตีนสูงที่สุดจึงเหมาะสำหรับการผลิตอาหารสัตว์ที่ใช้ทดแทนอาหารชั้นสำหรับการเลี้ยงสัตว์เคี้ยวเอื้อง ในส่วนของอาหารสัตว์จากชานอ้อยและเปลือกข้าวโพดให้พลังงานและเยื่อใย (NDF และ ADF) สูง เหมาะสำหรับการผลิตอาหารสัตว์หมัก

สำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้อง เนื่องจากค่า NDF ที่สูงอาหารจะใช้ระยะเวลาหมักนานขึ้น การย่อยของอาหารจะช่วยให้เกิดการหลั่งของน้ำลายมากขึ้น จึงช่วยลดการเกิดความเป็นกรดเฉียบพลันในกระเพาะอาหาร และลดโอกาสเกิดโรค metabolic disease ได้อีกด้วย ดังนั้นแบคทีเรีย *B. subtilis* MT2-428 จึงเหมาะสมสำหรับการนำไปผลิตอาหารสัตว์หมักจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรตลอดทั้งปีตามความต้องการของผู้ประกอบการ และยังช่วยลดการเผาซึ่งก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศ ส่งเสริมให้เกิดการจัดการเศษวัสดุทางการเกษตรอย่างถูกวิธีและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม



บรรณานุกรม



บรรณานุกรม

- กู้เกียรติ อัดตะวิริยะสุข. (2564). คู่มือการปฏิบัติงานวิธีวิเคราะห์วัตถุแห้งในอาหารสัตว์. [คู่มือปฏิบัติงาน]คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.
<http://www.repository.rmutt.ac.th/dspace/bitstream/123456789/4126/1/20230623-Work%20Manual-KuKiat%20A.pdf>
- กระทรวงดิจิทัลเพื่อเศรษฐกิจและสังคม. (2562). ลักษณะการถือครองที่ดินทางการเกษตรจำแนกเป็นรายภาคและจังหวัด พ.ศ.2562. [สถิติ]Google. WWW.OAE.GO.TH/VIEW/1/%E0%B8%81%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B9%83%E0%B8%8A%E0%B9%89%E0%B8%97%E0%B8%B5%E0%B9%88%E0%B8%94%E0%B8%B4%E0%B8%99/TH-TH
- กรมควบคุมมลพิษ. (2552). การกำจัดขยะมูลฝอย แบบฝังกลบอย่างถูกหลักสุขาภิบาล (Sanitary Landfill) [จุลสาร]. สำนักจัดการกากของเสียอันตรายและสารอันตราย กรมควบคุมมลพิษ.
- กรมควบคุมมลพิษ. (2561). โครงการศึกษาแหล่งกำเนิดและแนวทางการจัดการฝุ่นละอองขนาดเล็กไม่เกิน 2.5 ไมครอนในพื้นที่กรุงเทพฯ และปริมณฑล [จุลสาร]. กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.
- กองวิจัยและพัฒนาการส่งเสริมการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร. (2563). สรุปผลการดำเนินงานโครงการรวมพลังสร้างมูลค่าจากไร่นาสู่สิ่งแวดล้อมอย่างยั่งยืนกิจกรรมเฉลิมพระเกียรติเนื่องในโอกาสมหามงคลพระราชพิธีบรมราชาภิเษก กรมส่งเสริมการเกษตร [เอกสารประกอบการประชุม]. สรุปผลการดำเนินงาน. กรุงเทพฯ.
- เกษม สุขสถาน และ ชูลี ชัยพิพัฒน์. (2523). อ้อย. สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ (เล่มที่5).
- ธนิสธา รัตน์ะ และ อรรถพล เขยสุกเกตุ. (2560). โครงการการปรับปรุงผิวพลาสติกโดยเทคนิค ล้ำพลาสติกที่ความดันบรรยากาศสำหรับประยุกต์เป็นวัสดุตกแต่ง [การศึกษาอิสระวิทยาศาสตร์บัณฑิต, มหาวิทยาลัยบูรพา]. <http://dspace.lib.buu.ac.th/xmlui/handle/1234567890/3823>.

- นรินทร์ เจริญพันธ์, ศักดิ์ชัย เศรษฐ์อนวัช และ สามารถ สายอุต. (2561). องค์ประกอบทางเคมีและ
แนวโน้มการใช้ประโยชน์จากผลพลอยได้และเศษวัสดุเหลือทิ้งจากการแปรรูปผลไม้เขตร้อน
4 ชนิด. *Scholarly Article*, 28(1), 113-128. DOI: 10.14456/tstj.2020.10.
- นันทน์ริณู พิสิฐรัชต์. (2560). ผลของมูลสัตว์ผสมน้ำบนกระจุกลำไยที่ปรับปรุงสภาพด้วยพลาสมาเจ็ท
ระบบความดันบรรยากาศ. [วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต, มหาวิทยาลัยบูรพา].
<https://buuir.buu.ac.th/bitstream/1234567890/6133/1/57920077.pdf>.
- ตุลญา โรจน์ทั้งคำ. (2563). การมีส่วนร่วมของประชาชน ชุมชน เกี่ยวกับการควบคุมการเผาวัสดุเหลือ
ใช้ทางการเกษตร. *วารสารผู้ตรวจการแผ่นดิน*, 13(1), 37-56.
- สุธีระ บุญญาพิทักษ์. (2564). ปัจจัยการจัดการวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรของเกษตรกรเพื่อลดการ
เผา กรณีศึกษา อำเภอบ้านไผ่ จังหวัดขอนแก่น [การค้นคว้าอิสระวิทยาศาสตรบัณฑิต,
สถาบันบัณฑิตพัฒนบริหารศาสตร์]. กรุงเทพฯ.
- สุนทร ตรีนันทวัน. (2553, 25 08). สัตว์เคี้ยวเอื้อง [บทความ]Google. <https://www.scimath.org/article-biology/item/560-ruminants>
- สมาคมฟิสิกส์ไทย. (2019, 28 10). พลาสมาเย็น (ว่าที่) เทคโนโลยีเพื่อเกษตรสีเขียวและอาหาร
ปลอดภัย [บทความฟิสิกส์]Google. <http://www.thaiphysoc.org/article/166/>
- สุนน โพธิ์จันทร์. (2552). การใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นอาหารสัตว์ การจัดการ
ความรู้กรมปศุสัตว์ [จุลสาร] <http://km.dld.go.th/th/index.php/th/research-system/knowledge-office/82-present-general/158-2009-12-24-02-49-57>.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2566). ผลพยากรณ์ปริมาณการผลิตพืชไร่ปี 2566 [ตาราง]Google.
<https://www.oae.go.th/assets/portals/1/files/durian66.pdf>.
- สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน). (มปป). อาหารสัตว์ ความสำคัญ และสิ่งที่ต้อง
ใส่ใจ [บทความ]สวท. <https://www.arda.or.th/detail/6127>.
- ภัทรานันท์ แวงวรรณ, วิไลภา แต้มทอง และ สุธีลักษณ์ ไกรสุวรรณ. (2560). แผ่นเส้นใยจากเปลือก
ข้าวโพด [conference]. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 55,
กรุงเทพฯ.

- รัชพล พะวงศ์รัตน์. (2558). กระบวนการปรับสภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส. *Science and Technology*, 2(1), 143-157.
- มลิวัลย์ บุญหล้า. (2554). การมีส่วนร่วมของเกษตรกรในการนำเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาใช้ประโยชน์ กรณีศึกษากันหนองสวรรค์ อ.เมือง จ.หนองบัวลำภู. *วารสารอนามัยสิ่งแวดล้อม*, 13(3), 3-12.
- วรรณเพ็ญ สุขเฉลิม. (มปป.). *การเคี้ยวเอื้อง สำคัญอย่างไร* [บทความ]Google. <https://www.vetagritech.com/%E0%B8%94%E0%B8%B9%E0%B8%9A%E0%B8%97%E0%B8%84%E0%B8%A7%E0%B8%B2%E0%B8%A1126203-%E0%B8%81%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B9%80%E0%B8%84%E0%B8%B5%E0%B9%89%E0%B8%A2%E0%B8%A7%E0%B9%80%E0%B8%AD%E0%B8%B7%E0%B9%89%E0%B8%AD%E0%B8%87-%E0%B8%AA%E0%B8%B3%E0%B8%84%E0%B8%B1%E0%B8%8D%E0%B8%AD%E0%B8%A2%E0%B9%88%E0%B8%B2%E0%B8%87%E0%B9%84%E0%B8%A3.html>
- วัชร คตินนท์กุล และ เจนจิรา ภูริรักษ์พิติกร. (2556). การปรับสภาพเปลือกข้าวโพดและเปลือกมะพร้าวด้วยของเหลวไอออนิก เพื่อเพิ่มผลผลิตน้ำตาลกลูโคส. *Bulletin of Applied Science*, 2(2), 26-34.
- วิลาวรรณ น้อยภา และ วาสินี ภัทติลน. (2564). *การจัดการและลดการเผาในพื้นที่เกษตรของประเทศไทย*. [บทความ]TEI Thailand Environment Institute. <https://tei.or.th/file/files/Agricultural%20Burning%20Management%20in%20ThailandTEI-th.pdf>.
- ศรีกาญจนา คล้ายเรือง, ศิลาภรณ์ ชื่นบาล, ปิยะนุช เนียมทรัพย์ และ ฐปน ชื่นบาล. (2561). *การผลิตเอโนไซม์ไซลาเนสของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับไลเคน*. [เอกสารประกอบการประชุม]. รายงานการประชุมวิชาการระดับชาติ ประจำปี 2561.
- อิชย์อาณิคม ชิตวิเศษ และชลธิชา จันแบ่งเงิน. (2567). *แนวทางการพัฒนาเศรษฐกิจหมุนเวียนเพื่อลดการเผาในภาคการเกษตร* [บทความ]Think Forward Center. <https://think.moveforwardparty.org/article/agriculture/4243/>.

- อภิตา บุญศิริ. (2559). ประโยชน์จากเปลือกทุเรียน. *เกษตรกรรม*, 2(9), 46-48.
<http://sos.agri.kps.ku.ac.th/kasetapirom/>.
- อุทัย. (2551, 1 สิงหาคม). เทคโนโลยีสร้างอาชีพ: โฟมไบโอ บรรจุภัณฑ์จากชานอ้อย ไม่มีสารก่อมะเร็ง ไม่ทำร้ายคุณ ไม่ทำลายโลก. *เส้นทางเศรษฐี*. 53.
- อัจฉราภรณ์ บุญมา. (2556). อิทธิพลของพลาสติกจากกากชื้อต่อการดัดแปรคุณสมบัติพื้นผิวของฟิล์มพอลิแลคติกแอซิด [วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, นครราชสีมา]. <http://sutir.sut.ac.th:8080/sutir/bitstream/123456789/5565/2/Fualltext.pdf>.
- Adrio, J. L. and Demain, A. L. (2014). Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, 4(1), 117–139. <https://doi.org/10.3390/biom4010117>.
- AOAC. (2000). Official methods of analysis, Association of official analytical chemists. 17th ed. Washington, USA.
- Bajpai, P. (2009). Encyclopedia of Microbiology (Third Edition). *Thapar Centre for Industrial Research and Development*, 600-612.
- Bajpai, P. (2014). Chapter 5 Sources, Production, and Classification of Xylanases. *Xylanolytic Enzymes*, 43-52.
- BBC News ไทย. (2566, 1 มีนาคม). ฝุ่น PM 2.5 : ไทยพบจุดความร้อนสูงสุดนับตั้งแต่ปี 2566 พบอยู่ในเขตป่าอนุรักษ์-ป่าสงวนเกือบ 80%. เข้าสู่ฤดูกาลฝุ่นพิษ เฝ้าในป่า ไร่อ้อย หรือนาข้าว ส่งผลพิษมากกว่า - BBC News ไทย.
- Bernard, J. K. (2013). Measuring the Dry Matter Content of Feeds. *UGA extension*.
- Bharathiraja, S., Suriya, J., Krishnan, M., Manivasagan, P. and Kim, S-K. (2016). Production of Enzymes from Agricultural Wastes and Their Potential Industrial Applications. *Adv Food Nutr Res*, 80, 125-148. DOI: 10.1016/bs.afnr.2016.11.003.

- Bjoern, S., Axel, F., Oliver, S. and Dietrich, K. (2013). Cold plasma effects on enzyme activity in a model food system. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, (19), 146-152. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.04.002>.
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(2), 248-254. [doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- ChemTalk. (n.d). *Amino Acid Chart* [article]Google. <https://chemistrytalk.org/amino-acid-chart/>.
- Collins, T., Gerday, C. and Feller, G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology review*, 29, 3-23. doi.org/10.1016/j.femsre.2004.06.005.
- Egbune, O. E., Eze, E., Edwards, A. R., Ezedom, T. and Tonukari, J. N. (2021). Enhancement of the nutritional value of elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) for use as animal feeds and for xylanase production. *Nigerian Journal of Science and Environment*, 19(2). 73-83.
- Eriksson, K. E. (1990). Biotechnology in the pulp and paper industry. *Wood Science and Technology*, 24, 79-101.
- Expresso. (2564). [ไขข้อสงสัย] พลังงานชีวมวลคืออะไร ต่างจากพลังงานชีวภาพอย่างไร. Energy. สืบค้นเมื่อ 26 มีนาคม 2566, จาก <https://blog.pttexpresso.com/what-is-biomass-energy-different-biogas-energy/>.
- Graminha, E. B. N., Goncalves, A. Z. L., Pirota, R. D. P. B., Balsalobre, M. A. A., Da, S. R. and Gomes, E. (2008). Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, 144, 1-22. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.09.029>.

- Hinterstoisser, B. and Salmen, L. (2000). Application of dynamic 2D ftir to cellulose. *Vibrational spectroscopy*, 22(1), 111-118. [https://doi.org/10.1016/S0924-2031\(99\)00063-6](https://doi.org/10.1016/S0924-2031(99)00063-6).
- Jalal, A., Rashid, N., Rasool, N. and Akhtar, M. (2009). Gene cloning and characterization of a xylanase from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain R5. *Journal of bioscience and bioengineering*, 107(4). <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2008.12.005>.
- Johnson, K. A. and Goody, R. S. (2011). The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis-Menten Paper. *Biochemistry*, 50(39), 8264-8269. <https://doi.org/10.1021/bi201284u>.
- Joshi, B. J., Priyadarshini, R. and Uthandi, S. (2022). Glycosyl hydrolase 11 (xynA) gene with xylanase activity from thermophilic bacteria isolated from thermal springs. *Microbial Cell Factories*, 21(62), 1-13. DOI: 10.1186/s12934-022-01788-3.
- Jun, T.Y., Arumugam, S.D., Latip, N.H.A., Abdullah, A.M. and Latif, P.A. (2010). Effect of activation temperature and heating duration on physical characteristics of activated carbon prepared from agriculture waste, *EnvironmentAsia*, 3, 143-148. DOI:10.14456/ea.2010.53.
- Kalawong, R., Wakayama, M., Anuntalabhochai, S., Wongsawad, C. and Sangwijit, K. (2018). Comparison and Characterization of Purified Cellulase and Xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens* CX1 and *Bacillus subtilis* B4. *Chiang Mai Journal of Science*, 45(1), 92-105.
- Ko, C. H., Tsai, C. H., Tu, J., Lee, H. Y., Ku, L. T., Kuo, P. A. and Lai, Y. K. (2010). Molecular cloning and characterization of a novel thermostable xylanase from *Paenibacillus campinasensis* BL11. *Process biochemistry*, 45(10), 1638-1644. doi.org/10.1016/j.procbio.2010.06.015.

- Kouzonis, D., Hageman, A. J., Soares, N., Michiels, J. and Schols, A. H. (2021). Impact of Xylanase and Glucanase on Oligosaccharide Formation, Carbohydrate Fermentation Patterns, and Nutrient Utilization in the Gastrointestinal Tract of Broilers. *Animals*, 11(5), 1285. doi.org/10.3390/ani11051285.
- Kumla, J., Suwannarach, N., Sujarit, K., Penkhrue, W., Kakumyan, P. and Jatuwong, K., et al. (2020). Cultivation of Mushrooms and Their Lignocellulolytic Enzyme Production Through the Utilization of Agro-Industrial Waste. *Molecules*, 25(12), 2811. doi.org/10.3390/molecules25122811.
- Laksuk, H., Anuntalabhochai, S., Sangwijit, K., Boonrueng, N., Suebsan, S. and Thongrote, C. (2019). Induced Mutations of Naked DNA by Atmospheric Pressure Plasma Jet (APPJ). *Srinakharinwirot Science Journal*. 35(2).
- Lee, J. S., Parameswaran, B., Lee, J. P., Park, S. H. (2008). Recent developments of key technologies on cellulosic ethanol production. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 67(11), 865-873.
- Lim, J. D., Leed, P. M., Rhee, D. M. W., Leong, K. C. and Chen, Z. (2015). Effect of surface treatment on adhesion strength between magnetron sputtered copper thin films and alumina substrate. *Applied Surface Science*, 355, 509–515. doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.07.141.
- Hu, L., Fang, X., Du, M. and Luo, F. (2020). Hemicellulose-Based Polymers Processing and Application. *American Journal of Plant Sciences*, 11(12), 2066-2079. DOI:10.4236/ajps.2020.1112146.
- Liu, M., Weng. X. and Sun, J. (2006). Expression of recombinant *Aspergillus niger* xylanase A in *Pichia pastoris* and its action on xylan. *Protein expression and purification*, 48(2), 292–299. doi.org/10.1016/j.pep.2006.04.007.
- Lubis, R., Saragih, S.W., Wirjosentono, B., Eddyanto, E., 2018. Characterization of durian rinds fiber (*Durio zubinthinus, murr*) from North Sumatera. *AIP Conf. Proc.* 2049. doi.org/10.1063/1.5082474.

- MannaPro nurturing life. (2024, 24 11). What Do NDF and ADF Values Mean? [article]Google. <https://mannapro.com/blogs/news/what-are-ndf-adf-values-horses>
- Maniatis, T., Sambrook, J. and Fritsch, E. F. (1982). Molecular Cloning. *A Laboratory Manual*, 76-85.
- Marangoni, A. G. (2003). Enzyme Kinetics: A Modern Approach. *Enzyme Kinetics: A Modern Approach*, 44 – 60.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- Mohammad, S., Behnam, N., Ali, K. and Ahmad, T. (2016). Hydrothermal Gasification Performance of Iranian Rice Straw in Supercritical Water Media for Hydrogen-Rich Gas Production. *Bioresources*, 11(3), 6362-6377. DOI:10.15376/BIORES.11.3.6362-6377.
- Morgan, D. (n.d.). *Digestive Enzymes and Digestive Enzyme Supplements*. Wellness and Prevention [บทความ] <https://www.hopkinsmedicine.org/health/wellness-and-prevention/digestive-enzymes-and-digestive-enzyme-supplements> 27.
- Muhammad, I., Umar, A. B., Muhammad, N. B., Rubina, N. B. and Quratulain, S. B. (2016). Optimization of process parameters for xylanase production by *Bacillus* sp. in submerged fermentation. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 2(3), 139-147. doi.org/10.1016/j.jrras.2015.10.008.
- Patel, K. and Prajapati, K. (2014). Xylanase Production by *Cladosporium* sp. from Agricultural Waste. *International Journal of Current Research and Academic Review*, 2(12), 84-90.
- Polsa, N., Suyotha, W., Suebsan, S., Anuntalabhochai, S. and Sangwijit, K. (2020). Increasing xylanase activity of *Bacillus subtilis* by atmospheric pressure plasma jet for biomass hydrolysis. *3 Biotech*, 10(1), 259.

- Prieur, B., Meub, M., Wittemann, M. and Klin, R. (2017). Phosphorylation of lignin: characterization and investigation of the thermal decomposition. *RSC Advances*, 2(7), 16866-16877. DOI: 10.1039/c7ra00295e.
- Qiu, J., Han, H., Sun, B., Chen, L., Yu, C., Peng, R. and Yao, Q. (2016). Residue mutations of xylanase in *Aspergillus kawachii* alter its optimum pH. *Microbiological Research*, 182, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.09.002>.
- Richards, H., Baker, P., Lwuoha, E. (2012). Metal Nanoparticle Modified Polysulfone Membranes for Use in Wastewater Treatment: A Critical Review. *Journal of Surface Engineered Materials and Advanced Technology*, 2(03), 183. DOI:10.4236/jsemat.2012.223029.
- Saha, U., Sonon, L., Hancock, D., Hill, N., Stewart, L., Heusner, G., Kissel, D, E. (2023). Common Terms Used in ANIMAL FEEDING AND NUTRITION. *UGA Cooperative Extension Bulletin 1367*. 1-18.
- Sangwijit, K., Jitonnorn J., Pitakrattananukool S., Yu, L, D. and S. Anuntalabhochai. (2016). Low-energy plasma immersion ion implantation modification of bacteria to enhance hydrolysis of biomass materials. *Surface & Coatings Technology*, 306, 336-340. doi.org/10.1016/j.surfcoat.2016.07.068.
- Shah, A, W, S., Xu, Q., Ullah, W, M., Zahoor., Sethupathy, S., Morales, M, G., Sun, J. and Zhu, D. (2023). Lignin-based additive materials: A review of current status, challenges, and future perspectives. *Additive Manufacturing*, 74. doi.org/10.1016/j.addma.2023.103711
- Stylianopoulos, C. (2013). Carbohydrates: Chemistry and Classification. *Encyclopedia of Human Nutrition*. (3), 256-271.
- Sunna, A., Antranikian, G. (1997). Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 17(1), 39–67. doi.org/10.3109/07388559709146606.

- Suri, P., Dwivedi, D., Rathour, K, R., Rana, N., Shrma, V., Bhatia, K, R. and Bhatt, K, A. (2020). Enhanced C-5 sugar production from pine needle wastes biomass using *Bacillus* sp. XPB-11 mutant and its biotransformation to bioethanol. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 12, 3663–3672. DOI:10.1007/s13399-021-01277-4.
- Taniguchi, H. and Honnda, Y. (2009). Amylases. *Encyclopedia of Microbiology*, (3), 159-173.
- Tendero, C., Tixier, C., Tristant, P., Demaison, J. and Leprince, P. (2006). Atmospheric Pressure Plasmas: A Review. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 61(1), 2-30. doi.org/10.1016/j.sab.2005.10.003.
- The EUPATI Open Classroom. (2022). *Example – Enzymes* [บทความ] <https://learning.eupati.eu/mod/book/view.php?id=229&chapterid=59>.
- Van Soest, P. J., Robertson, J, B. and Lewism, B, A. (1991). Methods for dietary fiber neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74, 3583-3597. doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2.



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Luria-Bertani Agar (LB agar)

Bacto-tryptone	1	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
Sodium chloride	1	กรัม
Agar	1.5	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

2. Luria-Bertani Agar + Ampicilin

ภาคผนวก ข. การเตรียมสาร

1. สารผสม DNA Extraction master mix

สารละลาย Tris-acetate pH 7.8	40 mM
สารละลาย Sodium acetate	20 mM
สารละลาย EDTA	10 mM
สารละลาย SDS	1%
น้ำสำหรับ PCR	

2. สารผสมสำหรับทำ PCR

10x Buffer	2	ไมโครลิตร
10 mM dNTP	0.6	ไมโครลิตร
MgSO ₄	0.4	ไมโครลิตร
F primer	0.5	ไมโครลิตร
R Primer	0.5	ไมโครลิตร
Taq DNA Polymerase	0.2	ไมโครลิตร
RNaseA	0.2	ไมโครลิตร

Template	0.5	ไมโครลิตร
dH ₂ O for PCR	15.1	ไมโครลิตร

3. การเตรียมสาร Dinitro salicylic acid (DNS)

ละลาย DNS 5 กรัมในสารละลาย Sodium hydroxide ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย Sodium potassium tartrate (จำนวน 150 กรัมซึ่งละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร) คนให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ถึง 500 มิลลิลิตร

4. การเตรียมสารละลายไซโลสมาตรฐาน

ชั่ง D-Xylose 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 100 มิลลิลิตร ใช้เป็นสารละลายมาตรฐานไซโลส ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

5. การเตรียมสารละลาย BSA มาตรฐาน

ชั่ง BSA 0.05 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 100 มิลลิลิตร ใช้เป็นสารละลายมาตรฐานโปรตีน ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค. การทำกราฟมาตรฐานของสารละลายไซโลสและโปรตีน

1. การวิเคราะห์ปริมาณไซโลสโดยใช้สาร Dinitro salicylic acid

1.1 เตรียมสารละลายไซโลสจากสารละลายมาตรฐานไซโลสความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.05-0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

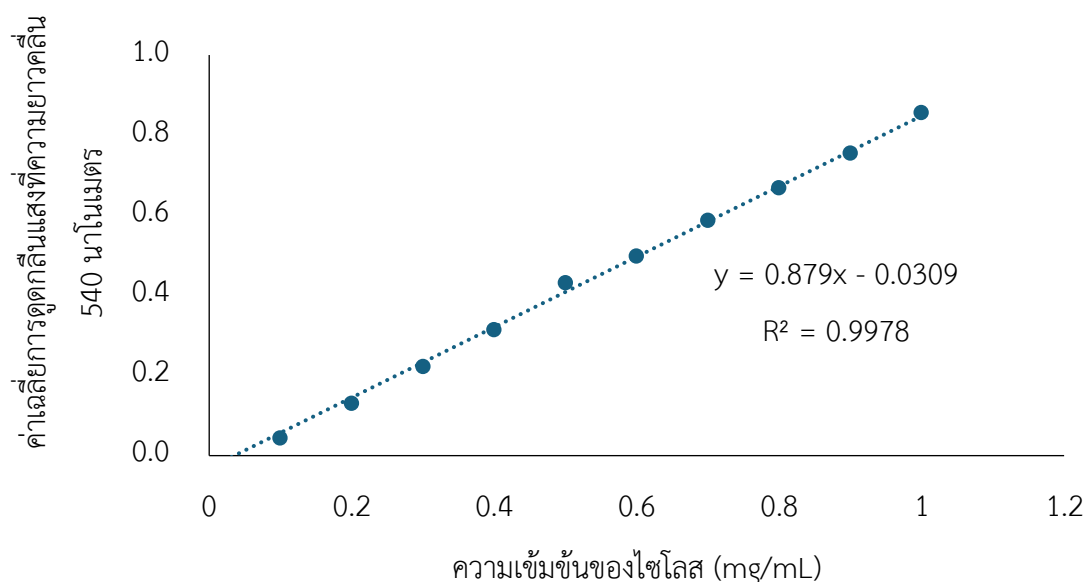
1.2 เติม DNS reagent ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ในแต่ละความเข้มข้น และต้มในน้ำเดือด 10 นาที จะเกิดสีน้ำตาลตามระดับปริมาณไซโลสในแต่ละหลอด จากนั้นทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

1.3 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มาสร้างเป็นกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD กับปริมาณไซโลส จากกราฟนำมาคำนวณสมการเส้นตรงได้ความสัมพันธ์เป็น

$$y = 0.879x - 0.0309$$

y คือ ค่าดูดกลืนแสง

X คือ ปริมาณไซโลสเป็นมิลลิกรัม/มิลลิลิตร



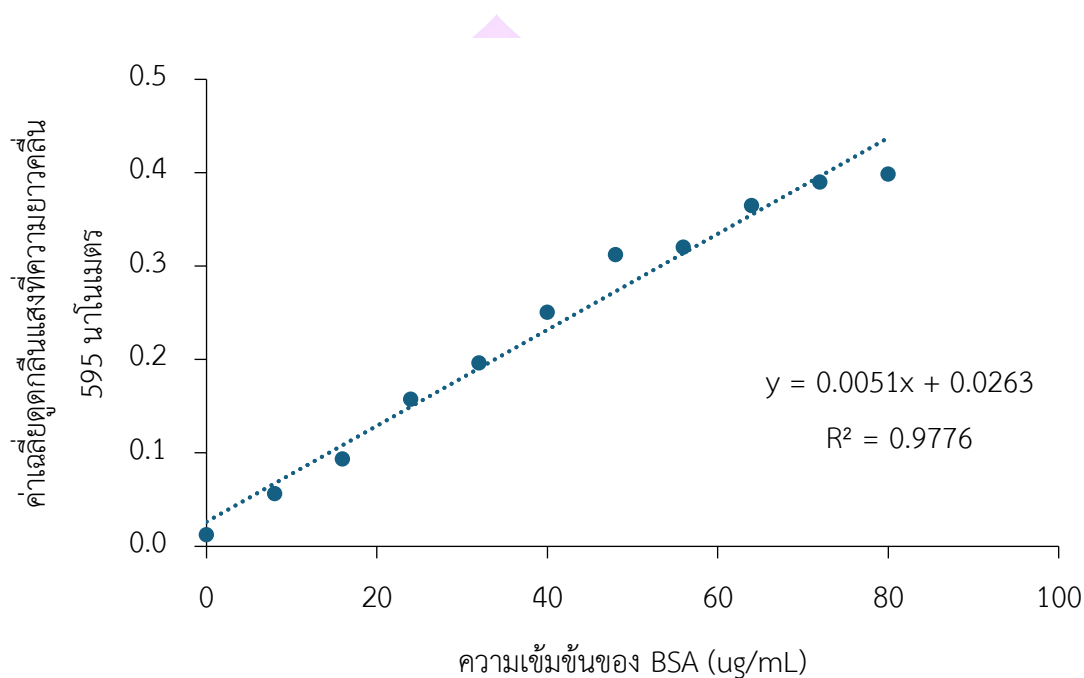
ภาพ 31 กราฟมาตรฐานไซโลส

2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยใช้สาร Bovine serum albumin

2.1 เตรียมสารละลายโปรตีนจากสารละลายมาตรฐานไซโลสความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1 - 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

2.2 นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 50 ไมโครลิตรผสม Bovine serum albumin ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที

2.3 นำไปวัดที่ค่าดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มาสร้าง เป็นกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD กับปริมาณไซโลส จากกราฟนำมาคำนวณสมการเส้นตรงได้ความสัมพันธ์เป็น



ภาพ 32 กราฟมาตรฐานโปรตีน

ภาคผนวก ง. การคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) และค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (specific activity)

1. การคำนวณปริมาณเอนไซม์ไซลานเนสเป็นมิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามหลักของ The International Union of Biochemistry

$$1 \text{ ยูนิตของไซลานเนส} = 1 \text{ ไมโครโมลของไซโลสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที}$$

$$= 0.150 \text{ มิลลิกรัมไซโลสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที}$$

ดังนั้น ไซโลส 0.150 มิลลิกรัม มีค่าเท่ากับ 1 ไมโครโมล

ถ้าเอนไซม์ย่อยสลายได้ไซโลส x มิลลิกรัม มี $\frac{x}{0.150}$ หรือ $6.667x$ ไมโครโมล

ใช้เวลา 15 นาที ไซโลสถูกปลดปล่อยออกมาเท่ากับ $6.667x$ ไมโครโมล

เวลา 1 นาที ไฮโดรเจนถูกปล่อยออกมาเท่ากับ $\frac{6.667x}{15}$ หรือ $0.444x$ ไมโครโมล/นาที

เมื่อใช้เอนไซม์ 0.2 มิลลิลิตร จะมีไฮโดรเจนเท่ากับ $0.44x$ ไมโครโมล/นาที

ดังนั้นถ้าใช้เอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตร

จะมีไฮโดรเจนเท่ากับ $\frac{0.44x}{0.1}$ หรือ $4.4x$ ไมโครโมล/นาที/มิลลิลิตร

ซึ่งมีค่าเท่ากับ $4.4x$ ไมโครโมล/นาที/มิลลิลิตร

ภาคผนวก จ. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (crude protein) (AOAC, 2000)

สารเคมีและอุปกรณ์

1. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น
2. สารเร่งปฏิกิริยา คอปเปอร์ซัลเฟต (Cu_2SO_4) 1 ส่วน : โพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) 9 ส่วน
3. สารประกอบโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 60 กรัมและโซเดียมไธโอซัลเฟต ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_2\text{H}_2\text{O}_2$) 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร
4. สารละลายกรดบอริก (H_3BO_3) 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร
5. สารละลายกรดเกลือ 0.0 นอร์มอล
6. อินดิเคเตอร์ใช้ fashiro indicator เป็น stock solution 0.2 กรัม ละลายในเอทานอล (ethanol) 200 มิลลิลิตร ซึ่งเมทิลเรด (methyl red) 0.05 กรัม ละลายในเอทานอล 50 มิลลิลิตร ก่อนใช้งานให้ผสม stock solution ต่อเอทานอลต่อน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1:2

มีวิธีการดังนี้

1. ชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรอง 1 – 2 กรัม ห่อให้มิดชิด ใส่ลงในขวดย่อยโปรตีน
2. เติมสารเร่งปฏิกิริยา 5 กรัมและกรดซัลฟิวริก 20 มิลลิลิตร
3. ใส่ลูกแก้ว 2 เม็ด จากนั้นนำไปย่อยบนเตาไฟในตู้ควั่นจนกระทั่งสารละลายเป็นสีใส ปล่อยให้เย็น
4. เติมน้ำกลั่นร้อนลงไปล้างบริเวณคอขวดให้ทั่ว และให้ความร้อนต่อไปจนควันของกรดซัลฟิวริกหมด ปล่อยให้เย็น

5. จากนั้นนำมาเทลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นล้างขวดย่อยโปรตีนให้สารละลายหมด และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร
6. จัดอุปกรณ์กลับ
7. นำขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมกรดบอริก 4% 5 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร และเติมอินดิเคเตอร์ นำไปรองรับของเหลวที่กลั่นโดยให้ส่วนปลายของอุปกรณ์ควมแน่นจุ่มลงในสารละลายกรดนี้
8. ดูดสารละลายตัวอย่างใส่ลงในช่องใส่ตัวอย่าง จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 20 มิลลิลิตร
9. กลั่นประมาณ 10 นาที ล้างปลายอุปกรณ์ควมแน่นด้วยน้ำกลั่นลงในขวดรองรับ
10. ไตรเตทสารละลายที่กลั่นได้กับกรดเกลือที่มีความเข้มข้น 0.02 นอร์มอล
11. ทำ blank ด้วยวิธีเดียวกันตั้งแต่วิธีที่ 2 – 10

มีวิธีการคำนวณดังนี้

$$\text{ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)} = \frac{(a - b) \times N \times 14 \times \text{Factor}}{W}$$

โดย

a = ปริมาณของสารละลายกรดเกลือที่ใช้ (มิลลิลิตร)

b = ปริมาณของสารละลายกรดเกลือที่ใช้กับ blank (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือ (นอร์มอล)

W = น้ำหนักของตัวอย่าง

14.07 = ค่าน้ำหนักสัมมูลย์ของไนโตรเจน

Factor = 6.25

ภาคผนวก จ. การวิเคราะห์หา Neutral Detergent Fiber (NDF) (Van Soest, 1991)

มีวิธีการดังนี้

1. ชั่ง sodium lauryl sulphate 60 กรัม ใส่ใน beaker ขนาด 400 มิลลิลิตร แล้ว นำมาใส่ใน Volumetric flask ขนาด 2 ลิตร โดยใช้กรวยกรองและแท่งคน สารละลายช่วย เสร็จแล้วล้าง Sodium lauryl sulphate ที่ติดค้างอยู่ใน beaker ด้วยน้ำร้อน โดยใช้ขวดฉีดน้ำร้อน ฉีดแล้วเทรวมใส่ใน Volumetric flask เดิม เขย่าเบา ๆ

2. เติม Triethylene glycol 20 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Volumetric flask ในข้อ (1.) เขย่าให้เข้ากัน

3. ละลาย disodium hydrogen phosphate anhydrous (Na_2HPO_4) 9.12 กรัม, Sodium borate decahydrate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 13.62 กรัม และ กรดเอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิติก (Disodium ethylenediaminetetraacetate: EDTA) dehydrate 37.22 กรัม ด้วยน้ำกลั่นที่ ร้อนแล้วนำมาผสมกับสารละลาย ในข้อ (2.) เทใส่ volumetric flask เขย่าให้ เข้ากัน แล้วเติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตรปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วปรับ ปริมาตรพอดีขีดด้วยน้ำกลั่นและปรับ pH ให้ได้ 6.9–7.1

ในกรณีที่ตัวอย่างนั้นวิเคราะห์หาเฉพาะค่า NDF

$$\% \text{NDF} = \frac{[(W1 - W2) \times 100]}{W3} - \% \text{neutral insoluble ash}$$

เมื่อ

$W1$ = น้ำหนัก crucible + น้ำหนักตัวอย่าง

$W2$ = น้ำหนัก crucible

$W3$ = น้ำหนักตัวอย่าง

%NDF insoluble ash คือ % ash ที่ได้จากขั้นตอนการเผาในการวิเคราะห์หา NDF

ภาคผนวก ข. การวิเคราะห์หาลิกนิน (lignin) (Van Soest, 1991)

การวิเคราะห์ลิกนินทำได้โดยใช้ตัวอย่างที่ได้จากการหา ADF มาทำการวิเคราะห์หา lignin โดยใช้ กรดกำมะถันความเข้มข้น 72 % ซึ่ง lignin ที่ทำได้โดยวิธีนี้เรียกว่า acid detergent lignin ลิกนิน ไม่จัดเป็น สารพวกคาร์โบไฮเดรตแม้จะมีคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน แต่ก็จัดเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของ ผนังเซลล์พืชทำให้เซลล์พืชมีความแข็งแรง

ตัวอย่างนั้นวิเคราะห์หาค่า Lignin

$$\% \text{NDF} = \frac{[(W1 - W2 \times 100)]}{W3} - \% \text{ Acid insoluble ash}$$

โดย

W1 = น้ำหนัก crucible + น้ำหนักตัวอย่าง

W2 = น้ำหนัก crucible

W3 = น้ำหนักตัวอย่าง

% Acid insoluble ash คือ % ash ที่ได้จากขั้นตอนการเผาในการวิเคราะห์หา lignin
 $\% \text{NDS} = 100 - (\% \text{Moisture}) - (\% \text{NDF})$

ภาคผนวก ข อาหารสัตว์หมักสำหรับ 60 วันโดยมีเปลือกทุเรียน ขานอ้อย และเปลือกข้าวโพด เป็นวัตถุดิบ

เปลือกทุเรียน ขานอ้อย และเปลือกข้าวโพด หมักโดยไม่เติมเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* MT3.4 และ MT2-428 ชุดควบคุม, เติมเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* MT3.4 และ *B. subtilis* MT2-428)

ตาราง 9 ตัวอย่างอาหารสัตว์หมักเปรียบเทียบที่ 0 วันและ 60 วัน โดยมี เปลือกทุเรียน ชานอ้อย และเปลือกข้าวโพดเป็นวัตถุดิบ

เงื่อนไขการหมัก	ระยะเวลาการหมัก	
	0 วัน	60 วัน
เปลือกทุเรียน	หมักโดยไม่เติมเชื้อ MT3.4 และ MT2-428 	
	หมักโดยเติมเชื้อแบคทีเรีย MT3.4 	
	หมักโดยเติมเชื้อแบคทีเรีย MT2-428 	
ชานอ้อย	หมักโดยไม่เติมเชื้อ MT3.4 และ MT2-428 	
	หมักโดยเติมเชื้อแบคทีเรีย MT3.4 	

ตาราง 9 (ต่อ)

เงื่อนไขการหมัก		ระยะเวลาการหมัก	
		0 วัน	60 วัน
ชานอ้อย	หมักโดยเติมเชื้อ แบคทีเรีย MT2-428		
	หมักโดยไม่เติม เชื้อ MT3.4 และ MT2-428		
เปลือก ข้าวโพด	หมักโดยเติมเชื้อ แบคทีเรีย MT3.4		
	หมักโดยเติมเชื้อ แบคทีเรีย MT2-428		

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	ธมลวรรณ ปั่นกอง
วัน เดือน ปี เกิด	17 เมษายน 2543
สถานที่เกิด	เชียงใหม่
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2561, วท.บ. (ชีววิทยา), มหาวิทยาลัยพะเยา, พะเยา
ที่อยู่ปัจจุบัน	117/1 หมู่ 4 ตำบลน้ำบ่อหลวง อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ 50120
ผลงานตีพิมพ์	ธมลวรรณ ปั่นกอง (ผู้บรรยาย). (23-24 พฤษภาคม 2567). การเพิ่มประสิทธิภาพและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮไลเนสจาก <i>Bacillus subtilis</i> พันธุ์กลาย ในการประชุมวิชาการระดับชาติ "วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 15" (หน้า 294-306). ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา

